

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Éderson Rodrigues Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE FLÚOR, CLORO E BROMO EM
AMOSTRAS DE CARVÃO E TECIDO BIOLÓGICO POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR
UTILIZANDO ANÁLISE DIRETA DE AMOSTRAS SÓLIDAS E
INVESTIGAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES DE
ARSENOLIPÍDEOS EM ÓLEO DE PEIXE**

Florianópolis - SC

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Éderson Rodrigues

Desenvolvimento de métodos para a determinação de flúor, cloro e bromo em amostras de carvão e tecido biológico por espectrometria de absorção molecular utilizando análise direta de amostras sólidas e investigação de novas espécies de arsenolipídeos em óleo de peixe / Éderson Rodrigues Pereira; orientador, Bernhard Welz - Florianópolis, SC, 2017.

162 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Halogênios. 3. Espectrometria de absorção molecular. 4. Arsênio. I. Welz, Bernhard. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE FLÚOR, CLORO E BROMO EM
AMOSTRAS DE CARVÃO E TECIDO BIOLÓGICO POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR
UTILIZANDO ANÁLISE DIRETA DE AMOSTRAS SÓLIDAS E
INVESTIGAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES DE ARSENOLIPÍDEOS
EM ÓLEO DE PEIXE**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina como parte dos
requisitos para a obtenção do grau
de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bernhard Welz

Florianópolis

*Este trabalho é dedicado à
minha família, em especial ao
meu pai Clodomiro.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade a mim concedida.

Ao professor Bernhard Welz pela orientação, dedicação, oportunidade, respeito e amizade, condições estas que permitiram a realização deste trabalho bem como meu crescimento profissional.

Ao professor Eduardo Carasek pela coorientação, amizade e os ricos conselhos direcionados a academia.

Aos orientadores Jörg Feldmann e Eva Krupp pela orientação, amizade, confiança, paciência e dedicação tanto na Universidade de Aberdeen (Escócia) quanto nos trabalhos realizados no Brasil.

Ao professor Daniel Lazaro Gallindo Borges que, além de participar da banca de qualificação, aceitou participar da banca avaliadora nesta etapa final. Professor este que se tornou um amigo e conselheiro acadêmico além de colaborar em diversos trabalhos secundários.

Aos professores Marco Zezzi, Cezar Bizzi, Augusto Madureira, Ivan Gonçalves e Luciano Vitali por aceitarem generosamente o convite para atuarem como membros da banca avaliadora.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC Ademir Neves, Giovanni Finoto Caramori e Vanderlei Gageiro Machado por participarem como banca de qualificação, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento da tese.

Ao professor Jailson de Andrade da Universidade Federal da Bahia pelo suporte e colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de cromatografia e espectrometria atômica (Cromas) pela amizade, confiança, momentos do café, sábados, domingos e feriados trabalhados, os quais foram enriquecedores com a participação de vocês. Muito obrigado pelo apoio nos momentos difíceis, nas investidas científicas e pela confiança depositada ao longo deste período. Sem a parceria e amizade de vocês nada disso seria possível. Muito obrigado.

Meus agradecimentos à gentil professora e amiga Vera Barkow pela paciência, longas conversas, apoio, respeito e ricas aulas de inglês.

Aos amigos que mesmo longe me apoiaram e o farão sempre com toda certeza.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao Programa de Aperfeiçoamento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

Meus agradecimentos à empresa Golden Omega (Chile) e ao colega Javier del Campo pelas amostras de óleo de peixe concedidas, as quais possibilitaram o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos colegas da secretaria do PPGQMC, Grace e Jadir, pela dedicação e amizade.

À Analytik Jena AG pela doação do equipamento Contra 600 e pelo suporte financeiro.

À minha família pelo incansável apoio e hombridade, respeito, dedicação, amor e amizade, meu muito obrigado. Em especial ao meu pai Clodomiro Rodrigues Pereira que me motiva pelo seu exemplo de honestidade, trabalho, dedicação e paciência, além do nosso amor incondicional, claro. Pai, mais uma etapa vencida.

RESUMO

Este trabalho descreve, na primeira parte, o desenvolvimento de três metodologias analíticas que fazem a determinação de flúor, cloro e bromo a partir de diferentes moléculas diatômicas, tais como CaF, SrCl e CaBr, respectivamente, formadas em forno de grafite (GF) e quantificadas por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS MAS). A primeira metodologia descreve a determinação de flúor em amostras de carvão utilizando análise direta de amostras sólidas (SS). A segunda metodologia descreve, pela primeira vez, o emprego da molécula SrCl na determinação de cloro em amostras biológicas utilizando SS. O espectro de absorção da molécula SrCl foi definido experimentalmente a partir de cálculos teóricos utilizando teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT) e encontrado experimentalmente em 635,862 nm, enquanto que zircônio e paládio foram avaliados como modificadores químicos permanentes. Por fim, a terceira metodologia demonstra a determinação de bromo em amostras de carvão utilizando SS. Este trabalho aborda uma nova estratégia para a determinação de bromo utilizando o reagente formador da molécula sem contato com a amostra. A exatidão de cada método foi avaliada utilizando diferentes materiais de referências certificados e, no caso de cloro e bromo, as concentrações encontradas pelos métodos propostos foram ainda comparadas com a técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e vaporização eletrotérmica (ETV-ICP-MS), mostrando boa concordância (test t-student, 95% de confiança) entre as duas técnicas de comparação e entre os resultados encontrados para os materiais de referência certificados. Além da efetiva contribuição para a determinação de cloro, também é importante destacar que estes trabalhos estão entre os poucos que utilizam SS como forma de introdução de amostra podendo ainda utilizar soluções padrão para o preparo das curvas de calibração para a determinação de halogênios.

A segunda parte do presente trabalho consiste no desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de arsênio total em amostras de óleo de peixe utilizando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite

(HR-CS GF AAS) e injeção direta da amostra diluída apenas com 1-propanol. Para isto, foi avaliada uma estratégia que fez uso da combinação de rutênio como modificador permanente e paládio adicionado em solução sobre a amostra a fim de encontrar um comportamento similar para as espécies orgânicas e inorgânicas presentes na matriz lipídica. A segunda parte compreende ainda a extração, isolamento e identificação de novas espécies de arsenolipídeos (AsLip), classe esta que inclui os ácidos graxos contendo arsênio (AsFA) e hidrocarbonetos contendo arsênio (AsHC) provenientes de amostras de óleo de peixe. As espécies de arsênio foram inicialmente extraídas utilizando um material poroso de argilominerais (bentonita) com posterior extração sequencial utilizando diferentes solventes orgânicos, seguida de purificação a partir de separação em coluna de fase normal preenchida com sílica gel. As diferentes frações resultantes da etapa de purificação foram então submetidas a etapas de separação, determinação e identificação de AsFA e AsHC utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado combinadas *online* com espectrometria de massa com ionização por eletrospray (RP-HPLC-ICP-MS/ESI-MS). Com o uso da bentonita como material adsorvente e a estratégia de purificação a partir de cromatografia em coluna de fase normal foi possível a identificação de cinco novas espécies de arsênio, sendo três espécies de AsFA de cadeia média (As-MCFA) e duas espécies de AsFA de cadeia longa (As-LCFA). A presença de As-MCFA nos extratos purificados levou à constatação da presença de espécies de arsênio conjugadas a estruturas de alta massa molecular, tais como triglicerídeos, pois, geralmente, espécies de baixa massa molecular tais como MCFA não ocorrem como ácidos graxos livres. Esta constatação pode ser suportada a partir da análise dos extratos de metanol que não passaram por nenhuma etapa de purificação e não apresentaram sinais analíticos das respectivas espécies de As-MCFA.

Palavras-chave: haogênios; determinação direta; arsênio; arsenolipídeos.

ABSTRACT

This work describes, in its first section, the development of three analytical methodologies, which demonstrate the determination of fluorine, chlorine and bromine from different diatomic molecules such as CaF, SrCl and CaBr, respectively, formed in graphite furnace (GF) and quantified by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry (HR-CS MAS) and direct solid sampling analysis (SS). The first methodology shows the determination of fluorine in coal samples using SS. The second one describes, at the first time, the use of the SrCl molecule in the determination of chlorine in biological samples using SS. The SrCl molecular spectrum was estimated preliminarily using time-dependent density functional theory (TD-DFT) calculations and found experimentally in the vicinity of the most sensitive line at 635.862 nm, while zirconium and palladium were evaluated as permanent chemical modifier. Finally, the third methodology shows the determination of bromine in coal samples employing SS. This work exhibits a new strategy for determination of bromine using the molecule-forming reagent separated from the sample in order to eliminate any interference. The accuracy of each method was evaluated using certified reference materials, and in the chlorine and bromine cases, the concentrations found with the proposed methodologies were compared to those obtained by electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS) showing good agreement (confidence level of 95%) between the both techniques and the certified values. Besides of the effective contribution for the direct determination of chlorine, it is necessary highlight in the fact that these works are among the few methodologies which use SS as a sample introduction approach and could use aqueous standards for calibration for the determination of halogens.

The second section consists of the development of a new method for the determination of total arsenic in fish oil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS) and direct analysis. The method does not use any sample pretreatment, besides dilution with 1-propanol, in order to decrease the oil viscosity. In this way, a strategy that made use

of the combination of ruthenium as permanent modifier and palladium in solution added over the sample has been evaluated in order to find a similar behavior among the organic and inorganic arsenic species from the lipid matrix. The second part further comprises the extraction, isolation and identification of five new arsenolipids (AsLip), which include the arsenic containing fatty acids (AsFA) and arsenic containing hydrocarbons (AsHC) contained in the fish oil samples. The arsenic species were extracted initially using an adsorbent of high porosity of clay minerals (bentonite) with posterior extraction using different organic solvents, followed by a clean-up step using normal phase chromatography. The fractions from the clean-up stage were submitted to separation, determination and identification of AsFA and AsHC by reverse phase high-performance liquid chromatography coupled online to inductively coupled plasma mass spectrometry simultaneously to electrospray ionization mass spectrometry (RP-HPLC-ICP-MS/ESI-MS). Using the bentonite as adsorbent material and the clean-up approach from normal phase chromatography was possible the identification of five new arsenic species, among them, three AsFA of medium chain (As-MCFA) and two species of AsFA of long chain (As-LCFA). The presence of As-MCFA in the clean-up extracts allowed the speculation of arsenic species conjugated to organic structures of high molecular mass, such as triglycerides, since species of low molecular mass such as MCFA usually occur not as free fatty acids. This finding could be supported from the analysis of methanol extracts which have not been submitted to any clean-up procedure and showed no analytical signal of the respective species of As-MCFA.

Keywords: halogens; direct determination; arsenic speciation; arsenolipids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) e (B), um acessório manual comercial utilizado para introdução de amostras sólidas em GF. Os números 1, 2 e 3 em (A) representam: (1) o módulo principal, (2) pinça para manuseio da plataforma e (3) a plataforma de 41
- Figura 2.** Mecanismos de redução das espécies de arsenato (a) para arsenito (b), com os posteriores produtos de metilação: ácido monometilarsônico (c), monometilarsina (d), dimetilarsínico (e), dimetilarsina (f), óxido de trimetilarsina (g) e trimetilarsina (h). 46
- Figura 3.** Espectro de absorção resolvido temporalmente para a molécula CaF na faixa entre 605,7 nm e 606,5 nm. Condições: 30 ng de flúor (6 μL de uma solução de 5 mg L^{-1}) e adição de 10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} ; plataforma recoberta com 400 μg de zircônio como modificador permanente; temperatura de vaporização de 2100 $^{\circ}\text{C}$ 60
- Figura 4.** Curvas de pirólise obtidas para a molécula CaF utilizando solução aquosa contendo 30 ng de flúor (6 μL de uma solução de 5 mg L^{-1}) e adição de 10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} ; temperatura de vaporização de 2100 $^{\circ}\text{C}$; plataformas recobertas com 400 μg de irídio (■) ou paládio (●) como modificadores permanentes e plataforma sem recobrimento (▲). Cada ponto e barra de erros representam a média de três medidas e o desvio padrão de $n=3$ 61
- Figura 5.** Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaF. Condições: 30 ng de flúor (6 μL de uma solução de 5 mg L^{-1}) e adição de 10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} ; temperatura de pirólise de 1100 $^{\circ}\text{C}$ para paládio (linha sólida) e irídio (linha tracejada), e temperatura de pirólise de 800 $^{\circ}\text{C}$ para plataforma sem modificador (linha pontilhada). Para todos os experimentos foi utilizada a temperatura de vaporização de 2200 $^{\circ}\text{C}$ 62
- Figura 6.** Curvas de vaporização para a molécula CaF obtida a partir de 30 ng de flúor (6 μL de uma solução 5 mg L^{-1}) e adição de 10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} ; temperatura de pirólise de 1100 $^{\circ}\text{C}$ para paládio (●) ou irídio (■), e temperatura de pirólise de 800 $^{\circ}\text{C}$ para plataforma sem modificador (▲). Cada ponto e barra de erros representa a média de três medidas e o desvio padrão de $n = 3$ 63

Figura 7. Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaF formada a partir de 0,7 mg de amostra de carvão (NIST 1632b) e 10 µL de solução de Ca²⁺ 10 g L⁻¹ adicionados em: plataforma de grafite (A) sem recobrimento; (B) contendo irídio como modificador permanente; e (C) contendo paládio como modificador permanente. Os perfis analíticos representam as temperaturas de pirólise de 700 °C (linha sólida), 800 °C (linha tracejada) e 900 °C (linha pontilhada). Temperatura de vaporização de 2200 °C. 65

Figura 8. Curva de vaporização para a molécula CaF gerada em GF utilizando SS de amostras de carvão (NIST 1632b, aproximadamente 0,7 mg), paládio como modificador químico permanente e 10 µL de solução de Ca²⁺ 10 g L⁻¹. Temperatura de pirólise fixada em 700 °C; n = 3. 67

Figura 9. Correlação entre a massa de Ca²⁺ e absorvância integrada normalizada obtida a partir de ≈ 0,7 mg de amostra de carvão (NIST 1632b). Temperaturas de pirólise e vaporização de 700 °C e 2100 °C, respectivamente. Média e SD obtidos utilizando n = 3. 68

Figura 10. Espectro de absorção simulado para a molécula SrCl utilizando cálculos teóricos TD-DFT. 73

Figura 11. Espectro de absorção resolvido temporalmente para a molécula SrCl na faixa entre 635,6 nm e 636,4 nm. Condições: 20 ng de cloro (20 µL de uma solução de 1 mg L⁻¹) e adição de 0,1 mg de Sr²⁺ (10 µL de uma solução de Sr²⁺ contendo 10 g L⁻¹). 74

Figura 12. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula SrCl formada à partir de 50 ng de cloro (10 µL de uma solução de 5 mg L⁻¹) e adição de 0,10 mg de Sr²⁺ (10 µL de uma solução de 10 g L⁻¹ de Sr²⁺). Para a otimização da temperatura de pirólise, a temperatura de vaporização foi fixada em 2100 °C e para a otimização da temperatura de vaporização, a temperatura de pirólise utilizada foi de 1000 °C para paládio (○) e plataforma sem recobrimento (■), e de 1200 °C para zircônio (▲). Média e SD obtidos utilizando n = 3. 75

Figura 13. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula SrCl formada utilizando aproximadamente 0,05 mg de amostra de referência RM 8414 (90 ng de cloro), adição de 0,10 mg de Sr²⁺ (10 µL de uma solução de 10 g L⁻¹ de Sr²⁺) e zircônio como modificador permanente. Para a otimização da temperatura de pirólise, a temperatura de vaporização foi fixada em 2100 °C enquanto que, para a otimização da

temperatura de vaporização, a temperatura de pirólise utilizada foi de 600 °C. Média e SD obtidos utilizando n = 3..... 77

Figura 14. Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula SrCl formada a partir de $\approx 0,05$ mg de amostra RM 8414 (≈ 90 ng de cloro), adição de 0,10 mg de Sr^{2+} (10 μL de uma solução de 10 g L^{-1} de Sr^{2+}) e zircônio como modificador permanente. As linhas representam o sinal analítico obtido em temperaturas de pirólise de 600 °C (linha sólida), 700 °C (linha tracejada) e 800 °C (linha pontilhada). Para todos os experimentos foi utilizada a temperaturas de vaporização de 2100 °C. 78

Figura 15. Espectro de absorvância resolvido temporalmente para a molécula CaBr com um máximo de absorção em 625,315 nm utilizando 120 ng de bromo (6 μL de uma solução de 20 mg L^{-1}), adição de 20 μL de solução de Ca^{2+} contendo 20 g L^{-1} e zircônio como modificador químico permanente. 85

Figura 16. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula CaBr formada à partir de 120 ng de bromo (6 μL de uma solução de 20 mg L^{-1}) e adição de 20 μL de uma solução 20 g L^{-1} (0,20 mg de Ca^{2+}). Para a otimização da temperatura de pirólise (A), a temperatura de vaporização foi fixada em 1900 °C enquanto que, para a otimização da temperatura de vaporização (B), a temperatura de pirólise utilizada foi 1350 °C para zircônio (■), 1000 °C para rutênio (○), 1500 °C para paládio (Δ), e 1000 °C para plataforma sem recobrimento (◆), respectivamente. Média e SD obtidos utilizando n = 3. 86

Figura 17. Sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaBr utilizando 1,5 mg de amostra (BCR 182), zircônio como modificador permanente e SS; linha sólida: 20 μL de solução de Ca^{2+} de 20 g L^{-1} adicionados sobre a amostra; linha pontilhada: 50 μL de solução de Ca^{2+} contendo 20 g L^{-1} introduzidos diretamente no tubo de grafite e colocando a plataforma de grafite SS contendo amostra depositada sobre a solução. 88

Figura 18. Correlação entre a massa de Ca^{2+} pipetada no tubo de grafite e absorvância normalizada para 3 mg de CRM BCR 180 (referente à 100 ng de bromo). Condições: Temperaturas de pirólise e vaporização de 1100 °C e 2200 °C, respectivamente. Média \pm SD (n = 3). 89

Figura 19. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula CaBr formada à partir de 3 mg de CRM BCR 182 com plataforma de grafite SS contendo zircônio (○) e paládio (▲) como modificadores químicos permanentes. Para a otimização das temperaturas de pirólise (A), a temperatura de vaporização foi fixada em 2100 °C enquanto que, para a otimização da temperatura de vaporização (B), a temperatura de pirólise utilizada foi de 1100 °C para os dois modificadores. Massa de Ca²⁺: 1,0 mg (50 µL de uma solução 20 g L⁻¹). Média ± SD (n = 3). 90

Figura 20. Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaBr para a vaporização de 30 ng de bromo e adição de 50 µL de uma solução de Ca²⁺ contendo 20 g L⁻¹. Linha sólida: temperatura de pirólise de 800 °C, A_{int} = 0,058 s; linha pontilhada: temperatura de pirólise de 900 °C, A_{int} = 0,122 s; linha tracejada: temperatura de pirólise de 1000 °C, A_{int} 0,143 s. Temperatura de vaporização de 2200 °C. 92

Figura 21. Esquema do fracionamento e identificação das espécies de arsênio utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS. 101

Figura 22. Curvas de pirólise e atomização para 10 ng de arsênio (10 µL de uma solução contendo 1 mg L⁻¹ de As³⁺). A temperatura de atomização foi fixada em 2200 °C para a otimização das temperaturas de pirólise, enquanto que, para a otimização a temperatura de atomização, as temperaturas de pirólise foram fixadas em 900 °C para plataforma sem modificador (■), 1400 °C para Ir (▲) ou Ru (●)..... 102

Figura 23. Curvas de pirólise e atomização obtidas a partir de 20 µL de solução (0,5 g de Amostra A diluído para 5 mL com 1-propanol). Para a otimização das temperaturas de pirólise, a temperatura de atomização foi fixada em 2200 °C; para a otimização das temperaturas de atomização, as temperaturas de pirólise foram fixadas em 1200 °C para plataforma sem recobrimento (■) e 1500 °C para irídio (▲) ou rutênio (●). 104

Figura 24. Curvas de pirólise e atomização obtidas a partir de 20 µL de solução (0,5 g de amostra A diluído para 5 mL com 1-propanol) e 10 µg de paládio (10 µL de uma solução contendo 10 g L⁻¹ de Pd). Para a otimização das temperaturas de pirólise, a temperatura de atomização foi fixada em 2200 °C; para a otimização das temperaturas de atomização as temperaturas de pirólise foram fixadas em 1500 °C para plataforma sem recobrimento (■), 1400 °C para irídio (▲) e 1500 °C para rutênio (●). 105

Figura 25. Sinais analíticos para 10 ng de arsênio (10 µL de soluções contendo 1 mg L⁻¹) de arsenito - As³⁺, ácido monometilarsênico – MMA, ácido dimetilarsônico – DMA, arsenobetaína – AsB, ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsênico – ROX e ácido p-arsanílico - p-ASA. Condições: plataforma de grafite recoberta com 400 µg de rutênio (10 injeções de 40 µL contendo 40 µg); 10 µg de paládio (10 µL de uma solução contendo 1 g L⁻¹ de Pd) adicionados sobre a amostra; temperatura de pirólise e atomização de 1400 ° e 2300 °C, respectivamente..... 107

Figura 26. Cromatogramas obtidos no monitoramento de espécies de arsênio e fósforo a partir de HPLC-ICP-MS para os diferentes extratos K (A), L (B), M (C) e N (D) provenientes do fracionamento utilizando coluna de fase normal, misturas de clorofórmio/metanol com porções de 2:1 (v/v), 1:1 (v/v), 1:2 (v/v) e metanol..... 112

Figura 27. Cromatogramas obtidos para as espécies de arsênio provenientes da fração N utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS. Os números dos respectivos picos cromatográficos correspondem às fórmulas moleculares listadas na Tabela 15..... 115

Figura 28. Estruturas moleculares propostas para as espécies de AsLip desconhecidas (D1 – D5), bem como as massas moleculares teóricas [M+H]⁺ identificadas na fração clorofórmio/metanol do extrato purificado em coluna de fase normal. 119

Figura 29. Cromatograma obtido utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS e 2 g de amostra bentonita extraída a partir de 5 mL de metanol, agitadas por 2 minutos e injetada diretamente sem etapa de purificação em comparação ao cromatograma obtido para o extrato N (purificado). Os números 3 - 8 referentes aos picos cromatográficos são os mesmos identificados na Figura 27. 121

Figura 30. Estrutura proposta para um triglicerídeo contendo arsênio. Os subscritos n, x e z representam os números de carbonos em cada cadeia..... 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programa de temperatura utilizado para a deposição dos modificadores químicos permanentes na plataforma de grafite para a determinação de flúor, cloro e bromo por HR-CS GF MAS.....	54
Tabela 2. Programas de temperaturas utilizados para a determinação de flúor, cloro e bromo por HR-CS GF MAS a partir de soluções padrão ou análise direta de amostras sólidas.....	55
Tabela 3. Parâmetros operacionais utilizados nas determinações de cloro e bromo por SS-ETV-ICP-MS.	56
Tabela 4. Comprimento de onda e parâmetros de mérito determinados experimentalmente e utilizados para a determinação de flúor por HR-CS SS-GF MAS a partir de calibração utilizando padrões em soluções.	70
Tabela 5. Determinação de flúor em diferentes amostras certificadas de carvão utilizando HR-CS SS-GF MAS. Os valores representam a média de cinco medidas \pm SD.....	71
Tabela 6. Limites de detecção, massas características, tipo de amostra e moléculas utilizadas para a determinação de flúor por GF MAS e F MAS em comparação com a metodologia desenvolvida neste estudo. .	72
Tabela 7. Figuras de mérito encontrados para a determinação de cloro por SS-HR-CS GF MAS a partir de calibração utilizando soluções aquosas.	80
Tabela 8. Determinação de cloro em materiais biológicos de referência certificados por HR-CS SS-GF MAS em comparação com SS-ETV-ICP-MS. Os valores representam a média \pm SD.	81
Tabela 9. Limites de detecção, tipo de amostra e moléculas utilizadas para a determinação de cloro utilizando GF MAS e F MAS em comparação com a metodologia desenvolvida neste estudo.	83
Tabela 10. Determinação de bromo em diferentes amostras certificadas de carvão utilizando HR-CS SS-GF MAS a partir de calibração utilizando padrões em solução em comparação com SS-ETV-ICP-MS. Os valores representam a média \pm SD (n = 5).....	93

Tabela 11. Programa de temperatura utilizado para a determinação de arsênio total por HR-CS GF AAS a partir de soluções padrão ou análise direta de amostras diluídas em 1-propanol.....	96
Tabela 12. Temperatura e programa de pressão utilizados para a digestão de aproximadamente 0,3 g de amostra de óleo de peixe e uma mistura de 5 mL de HNO ₃ concentrado e 3 mL de H ₂ O ₂ 30% (m/m).	100
Tabela 13. Parâmetros de mérito encontrados para a determinação de arsênio utilizando HR-CS GF AAS e curva de calibração a partir de solução padrão.	108
Tabela 14. Determinação de arsênio total em amostras de óleo de peixe por HR-CS GF AAS a partir de injeção direta e extrato digerido por radiação micro-ondas e por ICP-MS utilizando extratos digeridos por radiação micro-ondas.	109
Tabela 15. Fórmula molecular, massa experimental e calculada, erro relativo e recuperação para os diferentes compostos identificados por HPLC-ICP-MS/ESI-MS em modo positivo [M+H] ⁺ a partir do extrato N. A recuperação descrita (R%) foi calculada em relação à concentração total das espécies de arsênio encontradas no extrato N.....	116

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1 - Determinação de cloro em amostras de carvão utilizando HR-CS GF MAS e análise direta de sólidos	143
Apêndice 2 - Determinação de cloro em amostras de óleo de peixe utilizando HR-CS GF MAS	148
Apêndice 3 - Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_9H_{20}O_3As^+$ (D1), identificado a partir do extrato N purificado	155
Apêndice 4 - Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{11}H_{24}O_3As^+$ (D2), identificado a partir do extrato N purificado	156
Apêndice 5 - Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{12}H_{26}O_3As^+$ (D3), identificado a partir do extrato N purificado utilizando coluna de fase normal	157
Apêndice 6 - Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{13}H_{28}O_3As^+$ (D4), identificado a partir do extrato N purificado utilizando coluna de fase normal	158
Apêndice 7 - Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{14}H_{30}O_3As^+$ (D5), identificado a partir do extrato N purificado utilizando coluna de fase normal	159
Apêndice 8 - Produção científica gerada durante o período de doutorado.....	160

ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (<i>atomic absorption spectrometry</i>)
AsB	Arsenobetaina (<i>arsenobetaine</i>)
AsC	Arsenocolina (<i>arsenocholine</i>)
AsFA	Ácido graxo contendo arsênio (<i>arsenic containing fatty acid</i>)
AsHC	Hidrocarboneto contendo arsênio (<i>arsenic containing hydrocarbons</i>)
As-LCFA	Ácido graxo de cadeia longa contendo arsênio (<i>arsenic containing long chain fatty acids</i>)
AsLip	Arsenolipídeos (<i>arsenolipids</i>)
As-MCFA	Ácido graxo de cadeia média contendo arsênio (<i>arsenic containing medium chain fatty acids</i>)
AsPh	Fosfolipídeo contendo arsênio (<i>arsenic containing phospholipids</i>)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>charge coupled device</i>)
CRM	Material de referência certificado (<i>certified reference material</i>)
CS	Fonte contínua (<i>continuum source</i>)
DMA	Ácido dimetilarsínico (<i>dimethylarsinic acid</i>)
E_{el}	Energia eletrônica (<i>electronic energy</i>)
E_{rot}	Energia rotacional (<i>rotation energy</i>)
ESI	Ionização por eletrospray (<i>electrospray ionization</i>)
ETV-ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vaporização eletrotérmica (<i>electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
E_{vib}	Energia vibracional (<i>vibration energy</i>)

GC	Cromatografia gasosa (<i>gas chromatography</i>)
GF	Forno de grafite (<i>graphite furnace</i>)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (<i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HR-CS AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (<i>high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry</i>)
IC	Cromatografia de íons (<i>ion chromatography</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria óptica com plasma indutivamente acoplado (<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ISE	Eletrodo íon seletivo (<i>ion selective electrode</i>)
LOD	Limite de detecção (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (<i>limit of quantification</i>)
LS	Fonte de linha (<i>line source</i>)
m_o	Massa característica (<i>characteristic mass</i>)
MAS	Espectrometria de absorção molecular (<i>molecular absorption spectrometry</i>)
MIC	Combustão iniciada por micro-ondas (<i>microwave-induced combustion</i>)
MIP-AES	Espectrometria de emissão atômica por plasma induzido por micro-ondas (<i>microwave induced plasma-atomic emission spectrometry</i>)
MMA	Ácido monometilarsênico (<i>Monomethylarsonic acid</i>)
MS	Espectrometria de massa (<i>mass spectrometry</i>)
PO	Monóxido de fósforo (<i>phosphor monoxide</i>)

PVSA	Absorbância selecionada do volume do pico (<i>peak volume selected absorbance</i>)
qTOF-MS	Espectrometria de massa com analisador por quadrupolo-tempo de voo (<i>quadrupole time-of-flight mass spectrometer</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (<i>relative standard deviation</i>)
SS	Análise direta de amostra sólida (<i>solid sampling analysis</i>)
SS-GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com análise direta de sólidos (<i>graphite furnace atomic absorption spectrometry with solid sampling analysis</i>)
TD-DFT	Teoria do funcional da densidade dependente do tempo (<i>Time-dependent density functional theory</i>)
XRF	Fluorescência de raios X (<i>X-ray fluorescence</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	33
1.1	Determinação de flúor, cloro e bromo utilizando espectrometria de absorção molecular.....	33
1.1.1	Halogênios.....	33
1.1.2	Espectrometria de absorção molecular	35
1.1.3	Análise direta de amostras sólidas.....	39
1.2	Determinação de arsênio total e análise de especiação de arsênio	43
1.2.1	Arsênio	43
1.2.1.1	Espécies de arsênio lipossolúveis	44
1.2.1.2	Extração, identificação e elucidação estrutural de arsenolipídeos	46
1.2.1.3	Extração das espécies lipídicas de arsênio.....	47
1.2.1.4	Análise de especiação de arsenolipídeos utilizando RP-HPLC-ICP-MS.....	49
1.2.1.5	Análise de especiação de arsênio via RP-HPLC-ESI-MS	50
2	OBJETIVOS.....	51
2.1	Geral.....	51
2.2	Específicos	51
	PARTE 1 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FLÚOR, CLORO E BROMO POR HR-CS GF MAS E ANÁLISE DIRETA DE AMOSTRAS SÓLIDAS	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1	Instrumentação	53
3.2	Reagentes e materiais de referência certificados.....	57
3.3	Procedimento para a determinação de flúor por HR-CS SS-GF MAS em amostras de carvão.....	58

3.4	Procedimento para a determinação de cloro por HR-CS SS-GF MAS em amostras biológicas	58
3.5	Procedimento para a determinação de bromo por HR-CS SS-GF MAS em amostras de carvão	58
3.6	Procedimentos para a determinação de cloro e bromo por SS-ETV-ICP-MS em amostras biológicas e amostras de carvão.....	59
3.7	Fórmulas utilizadas para o cálculo de LOD, LOQ e massa característica	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	Determinação de flúor em amostras de carvão	60
4.1.1	Estudo da região espectral de trabalho.....	60
4.1.2	Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões em solução	61
4.1.3	Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para SS 64	
4.1.4	Otimização da massa do reagente formador da molécula	67
4.1.5	Parâmetros de mérito e avaliação da exatidão.....	69
4.1.6	Comparativo com a literatura.....	71
4.2	Determinação de cloro em amostras biológicas.....	73
4.2.1	Estudo da região espectral de trabalho.....	73
4.2.2	Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões aquosos	75
4.2.3	Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para amostras sólidas	76
4.2.4	Otimização da massa do reagente formador da molécula	78
4.2.5	Parâmetros de mérito e avaliação da exatidão.....	79
4.2.6	Considerações sobre a molécula SrCl	81
4.3	Determinação de bromo em amostras de carvão.....	84
4.3.1	Estudo da região espectral de trabalho.....	84
4.3.2	Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões aquosos	85
4.3.3	Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para SS 87	

4.3.4	Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões em solução utilizando analito separado do reagente formador	91
4.3.5	Parâmetros de mérito e resultados analíticos.....	92
4.3.6	Mecanismos envolvidos na formação da molécula CaBr.....	94
5	CONCLUSÕES PARTE I.....	95
	PARTE II – DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSENOLIPÍDEOS EM AMOSTRAS DE ÓLEO DE PEIXE	96
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
6.1	Instrumentação	96
6.2	Reagentes e materiais de referência	97
6.3	Amostras	98
6.4	Procedimento para a determinação de arsênio total utilizando HR-CS GF AAS	99
6.5	Procedimento para a digestão assistida por radiação micro-ondas.....	99
6.6	Procedimentos para extração sequencial dos compostos	100
6.7	Procedimentos para o fracionamento utilizando coluna preparativa.....	100
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
7.1	Determinação de arsênio total por HR-CS GF AAS	102
7.1.1	Otimização das temperaturas de pirólise e atomização para solução padrão	102
7.1.2	Otimização das temperaturas de pirólise e atomização para amostras de óleo de peixe.....	103
7.1.3	Calibração e parâmetros de mérito	107
7.1.4	Determinação de arsênio total em óleo de peixe por HR-CS GF AAS e ICP-MS.....	109

7.2	Determinação de arsênio total nas frações provenientes da extração sequencial.....	110
7.2.1	Identificação das espécies de arsênio nos extratos fracionados	111
7.2.2	Quantificação das espécies de arsênio utilizando HPLC-ICP-MS	119
7.2.3	Integridade e toxicidade das espécies de arsênio	120
8	CONCLUSÕES PARTE II	123
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
	APÊNDICES	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Determinação de flúor, cloro e bromo utilizando espectrometria de absorção molecular

1.1.1 Halogênios

Atualmente, os halogênios flúor, cloro e bromo estão entre os principais constituintes envolvidos em diferentes linhas de pesquisas, principalmente pela gama de compostos que formam e pela alta capacidade de serem liberados para a atmosfera através de processos químicos e/ou físicos (XU, 2004; ZHANG *et al.*, 2007). A toxicidade ou essencialidade desses elementos tem sido explorada continuamente nas últimas décadas com o intuito de explicar o comportamento desses elementos no meio ambiente e nos seres humanos (MELLO *et al.*, 2013).

O flúor é o mais reativo dos elementos químicos e possui forte tendência em adquirir carga negativa para então formar compostos com um grande número de cátions, os quais podem ser encontrados em uma variedade de minerais. A distribuição de flúor na atmosfera está associada a atividades vulcânicas e/ou queima de substâncias, por exemplo, o carvão mineral, a qual pode gerar diferentes espécies reativas, tais como HF, SiF₄ e CF₄ provenientes da combustão, sendo estas altamente tóxicas após liberadas para a atmosfera (BETTINELLI, 1983; LIU *et al.*, 2006). Embora o flúor seja essencial para os seres humanos, em elevadas concentrações pode ser tóxico. O excesso de flúor pode bloquear diferentes enzimas e causar diversas desordens imunológicas, problemas gastrointestinais e fluorose óssea, sendo esta última uma das maiores causas de mortalidade em diferentes regiões do mundo (KONIECZKA *et al.*, 2000).

O cloro está entre os vinte elementos mais abundantes na crosta terrestre e tem sido muito empregado na indústria química para a produção de diferentes produtos manufaturados, bem como na produção de pesticidas (herbicidas fungicidas e inseticidas), os quais estão, geralmente, associados a moléculas orgânicas de alto peso molecular e/ou anéis aromáticos condensados (organoclorados) (DEBORDE *et al.*,

2008). Em sua forma iônica não apresenta risco à saúde, no entanto, quando ligado a compostos orgânicos pode se tornar um contaminante de elevada toxicidade, persistente e de fácil bioacumulação em plantas e animais devido a alta lipofilicidade. Ainda, o cloro, devido ao poder oxidante de algumas espécies reativas, ser tóxico em elevadas concentrações, podendo causar irritações nas membranas mucosas e pulmonares, além de lesões graves nos olhos, nariz e garganta (BOZEMAN *et al.*, 2002; DEBORDE e VON GUNTEN, 2008).

Diferentemente do flúor e do cloro, não são conhecidas funções essenciais do elemento bromo nos seres humanos. Em termos de poluição ambiental, este halogênio ganha destaque dos demais, pois quando liberado em sua forma elementar reage com átomos de hidrogênio para formar HBr, sendo este altamente tóxico (HEEB *et al.*, 2014). Sua concentração crescente na atmosfera tem sido relacionada ao efeito estufa devido a danos significativos na redução de ozônio, efeito este maior do que o causado pelo cloro (YUNG *et al.*, 1980). No homem, elevadas concentrações de bromo têm sido relacionadas a diversas doenças carcinogênicas e até mesmo a depressão (PAVELKA *et al.*, 2002).

Devido à importância destes elementos para a saúde e para o meio ambiente, torna-se evidente o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar, com relativa exatidão, a concentração desses elementos em matrizes industriais, fluidos corporais, biológicas, ambientais e, principalmente, em matrizes utilizadas na produção de energia que dependem de etapas de queima, como, por exemplo, o carvão mineral. Métodos analíticos acurados e precisos possibilitam decisões e estratégias capazes de inibir possíveis contaminações ambientais, contribuindo significativamente para a melhora da saúde humana e controle do meio ambiente.

Diferentes métodos analíticos para a determinação de halogênios podem ser encontrados na literatura. Dentre eles, podem ser encontrados métodos que empregam a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (ZHU *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2007), métodos eletroanalíticos que fazem uso de eletrodo íon-seletivo (ISE) (DRESSLER *et al.*, 2003), espectrometria de fluorescência de raios X (XRF) (STURGEON *et al.*, 1985; RAGGI *et al.*, 1990; LAURSEN *et al.*, 1998) e ainda métodos baseados em cromatografia de íons (IC) acoplada a detectores por condutividade (NOGUCHI *et al.*, 2009). Técnicas que utilizam plasma para ionização destes elementos, tais como espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma

indutivamente acoplado (ICP OES), apresentam grandes dificuldades nas determinações de halogênios, principalmente devido às altas energias de ionização dos elementos comparada à energia de ionização do argônio, o gás geralmente empregado para geração do plasma. Além disso, no caso da técnica de ICP OES, as linhas de emissão dos halogênios flúor, cloro e bromo se situam na região de ultravioleta-vácuo (VUV), região esta inacessível aos detectores atuais. Problemas similares são encontrados para a técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS), pois, assim como as linhas de emissão dos elementos, as linhas de absorção estão situadas na região do VUV.

Quando passíveis de determinação pelas técnicas instrumentais citadas acima, em sua maioria, essas técnicas necessitam que a amostra seja previamente solubilizada a partir de um método de preparo de amostra. Métodos como pirohidrólise (DRESSLER *et al.*, 2003) ou combustão iniciada por micro-ondas (MIC) (FLORES *et al.*, 2008), têm sido muito bem descritos na literatura. Entretanto, até mesmo o uso desses métodos de preparo torna a determinação destes elementos um desafio analítico, pois além de serem métodos dispendiosos, a amostra é diluída de tal forma que o elemento pode não ser mais detectado pela técnica de quantificação empregada. Outro fator que desfavorece a utilização de etapas extras de preparo é a contaminação da amostra devido ao uso de reagentes químicos e materiais empregados.

De forma geral, as técnicas instrumentais supracitadas que permitem a determinação de flúor, cloro e bromo são técnicas complementares. Ou seja, nenhuma delas pode ser empregada com relativa exatidão para os três elementos sem limitações, seja por conta de interferentes na etapa de determinação ou pela alta faixa de concentração necessária para quantificação. Busca-se desta forma, técnicas instrumentais capazes de fazer a determinação desses halogênios com relativa precisão e exatidão e, se possível, com o mínimo preparo de amostra previamente às determinações.

1.1.2 Espectrometria de absorção molecular

A espectrometria de absorção molecular (MAS) foi proposta inicialmente por Haraguchi e Fuwa (HARAGUCHI *et al.*, 1975). Os autores utilizaram espectros de absorção molecular de diferentes

halogênios, tais como flúor, cloro e bromo, obtidos a partir de moléculas diatômicas de índio formadas em chama utilizando um equipamento de AAS convencional. Mais tarde, Dittrich *et al.* (DITTRICH, VORBERG, *et al.*, 1984) demonstraram ser possível a formação de diferentes moléculas diatômicas em fase gasosa entre os halogênios e os elementos gálio, alumínio, telúrio, índio e magnésio utilizando forno de grafite (GF) operado por um equipamento também convencional. No entanto os autores encontraram grandes dificuldades principalmente em relação à matriz em que o analito estava contido, a qual influenciou diretamente na intensidade do sinal analítico encontrado. Mais tarde, Dittrich *et al.* publicaram ainda sucessivos trabalhos que demonstraram ser possível a determinação de flúor (DITTRICH *et al.*, 1985), cloro (DITTRICH, SPIVAKOV, *et al.*, 1984b) e bromo (DITTRICH, SPIVAKOV, *et al.*, 1984a) utilizando MAS, porém as determinações deveriam ser acompanhadas de extrações líquido-líquido para eliminação de possíveis interferentes.

Os espectros moleculares consistem de transições eletrônicas entre os diferentes estados energéticos, os quais são formados pela mistura de orbitais atômicos dos átomos que compõem a molécula. Em temperaturas tipicamente empregadas nos estudos envolvendo AAS, entre 2000 °C e 3000 °C, apenas moléculas diatômicas e poucas moléculas triatômicas podem existir. Moléculas maiores acabam por serem dissociadas levando à formação de seus constituintes atômicos e/ou subprodutos, em sua maioria (WELZ *et al.*, 2009). As moléculas diatômicas que resistem às altas energias empregadas em técnicas espectrométricas que fazem uso de chama ou GF são a base da MAS e permitem que diferentes elementos sejam quantificados a partir de seus espectros moleculares.

Os espectros de moléculas diatômicas são compostos por um número muito maior de linhas quando comparados aos espectros atômicos. A complexidade desses espectros está relacionada aos dois graus de liberdade a mais presentes nos sistemas moleculares (vibracional e rotacional), os quais possibilitam um maior número de estados energéticos. Desta forma, os espectros moleculares são dependentes de três tipos de energias: as transições eletrônicas entre os diferentes estados energéticos, energia eletrônica (E_{el}); a energia interna devido à vibração dos núcleos, energia vibracional (E_{vib}); e as energias associadas ao movimento dos átomos em relação ao eixo perpendicular da própria molécula, energia rotacional (E_{rot}) (WELZ *et al.*, 2006; WELZ *et al.*, 2009).

Os espectros de excitação eletrônica são resultantes de transições causadas por elétrons que, após a absorção de energia, se encontram em orbitais moleculares de maior energia. Os “pacotes” energéticos necessários para tal transição eletrônica se assemelham aqueles encontrados nas transições atômicas, sendo, portanto, situados na região UV-Vis do espectro eletromagnético. Uma transição molecular eletrônica é caracterizada pela: (i) ordem energética dos estados eletrônicos, (ii) *spin* total dos elétrons, (iii) momento angular dos elétrons em relação ao eixo molecular, e (iv) propriedades simétricas da função de onda eletrônica, cujo valor quadrado descreve a probabilidade de se encontrar os elétrons em qualquer localização dentro da molécula (WELZ *et al.*, 2006; WELZ *et al.*, 2009).

De uma a duas ordens de magnitude menor que a E_{el} , a E_{vib} está presente em qualquer sistema molecular devido às vibrações presentes nos respectivos núcleos. Desta forma, as transições vibracionais, resultantes das E_{vib} , são tipicamente observadas na região do infravermelho do espectro eletromagnético e, no caso das moléculas diatômicas, são resultantes de uma única possibilidade de estiramento intranuclear que é em função do próprio eixo da molécula diatômica.

Uma terceira energia que compõe os espectros moleculares é a E_{rot} . A E_{rot} está, em geral, de duas a três ordens de magnitude menor que as energias envolvendo estiramento vibracional intranuclear e, portanto, são observados na região espectral do infravermelho distante ou micro-ondas. O efeito energético por conta da rotação dos átomos em função do centro de massa perpendicular ao eixo longitudinal molecular conota baixa contribuição nos espectros de absorção em moléculas diatômicas. No entanto, os estados vibracionais estão intimamente ligados às E_{rot} em um espectro de absorção molecular, pois as bandas provenientes da E_{vib} são formadas por um grande número de linhas rotacionais (WELZ *et al.*, 2006; WELZ *et al.*, 2009).

Desta forma, cada transição eletrônica é acompanhada de diversas transições vibracionais e, conseqüentemente, de um número muito grande de transições rotacionais, fazendo com que o pacote energético necessário para uma transição eletrônica seja a soma das três energias (E_{rot}) e se encontra na região UV-Vis. Em termos de magnitude, as diferentes energias que

compõe um espectro molecular podem ser classificadas como: $E_{\text{rot}} \ll E_{\text{vib}} \ll E_{\text{el}}$, ao passo que, a E_{tot} que compõe um espectro molecular será de acordo com a equação 1.

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{el}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}} \quad \text{Eq. 1}$$

Algumas moléculas, tais como PO, são formadas espontaneamente no atomizador em altas temperaturas (WELZ *et al.*, 2009). Entretanto, para a determinação de halogênios um reagente denominado “formador da molécula” é adicionado em excesso e a absorvância é monitorada de acordo com a lei de Beer (BUTCHER, 2013). Apesar de ser uma opção para a determinação de halogênios, esta técnica utilizando espectrômetros convencionais, ou seja, de baixa resolução, foi pouco aplicada principalmente devido às dificuldades encontradas no tratamento das interferências e pelas dificuldades na correção de fundo.

Foram necessários mais de quarenta anos para que este conceito de espectrometria molecular se consolidasse dentro das técnicas analíticas (WELZ *et al.*, 2014). O que possibilitou tal transformação foi um novo tipo de espectrômetro proposto em 1996 pelo grupo de Becker-Ross, que passaria a operar não mais com uma fonte de linha (LS), mas com uma fonte contínua (CS), um duplo monocromador de alta resolução (HR) formado por um monocromador de prisma *littrow* e um com rede *echelle* e um detector de arranjo linear de dispositivo de carga acoplada (CCD). Esta nova técnica passaria a se chamar então de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) e têm sido muito bem discutida na literatura (WELZ *et al.*, 2006; BUTCHER, 2013; WELZ *et al.*, 2014).

A técnica HR-CS AAS tem sido explorada para uma grande quantidade de elementos até então (RESANO *et al.*, 2006; CIFTCI *et al.*, 2012; VIRGILIO *et al.*, 2012; GUNDUZ *et al.*, 2013; RELLO *et al.*, 2013), mas a sua contribuição para a determinação de halogênios (FLORES *et al.*, 2007; GLEISNER *et al.*, 2010; FECHETIA *et al.*, 2012; KRÜGER *et al.*, 2012; FLÓREZ *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2014), enxofre (HUANG *et al.*, 2006b; BAYSAL *et al.*, 2011; BAUMBACH *et al.*, 2013; BAUMBACH *et al.*, 2014; GUNDUZ *et al.*, 2014), fósforo (LEPRI *et al.*, 2006; DESSUY *et al.*, 2007; DE CAMPOS *et al.*, 2011; BECHLIN *et al.*, 2013) e

nitrogênio (BRANDAO *et al.*, 2012; BRANDAO *et al.*, 2014) utilizando MAS (HR-CS MAS) tornou-se muito significativa. Esta expressiva contribuição é resultado não apenas do alto poder de resolução do duplo monocromador, mas também pela inerente possibilidade da técnica em utilizar análise direta de amostras sólidas (SS).

1.1.3 Análise direta de amostras sólidas

A SS em espectrometria de absorção atômica utilizando forno de grafite (SS-GF AAS) tem sido muito bem explorada na literatura para a determinação de diferentes elementos (SILVA *et al.*, 2004; VALE *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005; KOWALEWSKA, 2011; MORÉS *et al.*, 2011; BRANDAO *et al.*, 2012; LIMBURG *et al.*, 2013). Essa técnica dispensa o uso de solubilização da amostra e, conseqüentemente, diminui significativamente os riscos de contaminação, além de proporcionar limites de detecção (LOD) comparáveis ou até mesmo melhores que a técnica de ICP-MS (WELZ *et al.*, 2003).

De forma geral, esta estratégia analítica corrobora com os princípios da química verde, pois não depende de etapas de pré-tratamento da amostra a partir de processos químicos que envolvam decomposição com reagentes químicos, eliminando assim a geração de resíduos em laboratório e exposição do analista à substâncias tóxicas como ácidos ou bases concentradas.

Dentre outras vantagens associadas à técnica SS, a quantidade de amostra necessária para uma medida é mínima comparada aos métodos que envolvem digestão por via úmida ou por via seca. No caso da SS são necessárias quantidades de amostras tipicamente entre 0,1 e 2 mg. Este quesito permite que, mesmo com quantidade limitada de amostra, as medidas sejam efetuadas com relativa exatidão e precisão.

Embora todas essas características inerentes à SS sejam mais que suficientes para demonstrar suas vantagens em relação aos métodos que envolvem preparo de amostras, a simplicidade em se trabalhar com SS é uma de suas principais características. Quando algum procedimento

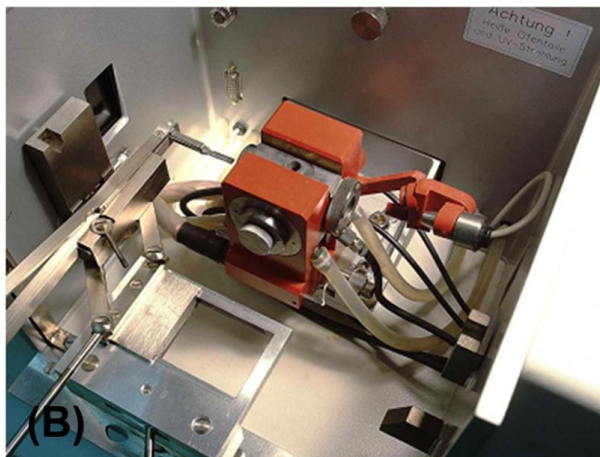
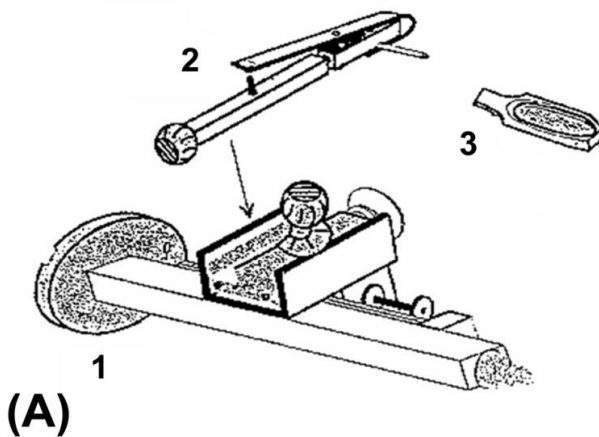
extra é requerido, este se trata apenas da moagem do material a fim de assegurar a homogeneidade da mesma para pesagem e introdução no GF. Entretanto, como a moagem da amostra seria necessária independente do método (digestão ou SS), o tempo total da análise está atrelado apenas ao tempo de pesagem somado ao programa de aquecimento do GF, o qual consiste das etapas de secagem, pirólise, vaporização e limpeza. Neste caso, temos outra característica da SS, a rapidez em se obter os resultados analíticos.

Claramente, as vantagens atribuídas aqui estão correlacionadas com a determinação de elementos em amostras de boa homogeneidade. Caso contrário, por se tratar da pesagem de pequenas massas de amostra, o resultado encontrado em uma determinação pode apresentar erros significativos em uma amostra complexa. Por conseguinte, esta limitação impacta diretamente no desvio padrão relativo (RSD) das medidas analíticas, de forma que, em análise de traço utilizando SS-GF AAS/MAS, são considerados RSD de até 15%. No entanto, estes maiores desvios comparados aos desvios encontrados para análises em solução (geralmente menores que 5%), não comprometem a exatidão do resultado analítico.

Atualmente, a utilização da SS como técnica de introdução de amostra pode ser feita de forma manual (Figuras 1A e 3B) ou utilizando dispositivos automáticos capazes de manusearem com relativa precisão as plataformas de grafite. No caso da introdução manual, as pesagens são dependentes de uma microbalança analítica (resolução de 1 μg) para posterior introdução da plataforma de grafite no GF. Já para os sistemas automatizados as pesagens são realizadas em microbalança integrada ao próprio sistema, restringindo ao analista o manuseio da amostra até esta etapa.

Esta última é amplamente utilizada para o preparo de curvas de calibração, no entanto, comportamentos diferentes em GF podem gerar sinais analíticos diferentes, comprometendo assim a exatidão do método utilizado. Duas estratégias analíticas têm sido adotadas para eliminar este efeito de incompatibilidade de sinais: i) uso de materiais de referência certificados (CRM), cuja concentração do analito é conhecida e a curva de calibração é feita em função do aumento de massa do material; e ii) uso de modificadores químicos permanentes e/ou em solução capazes de condicionar diferentes comportamentos do analito em um único de compromisso.

Figura 1. (A) e (B), um acessório manual comercial utilizado para introdução de amostras sólidas em GF. Os números 1, 2 e 3 em (A) representam: (1) o módulo principal, (2) pinça para manuseio da plataforma e (3) a plataforma de grafite.



Fonte: Adaptado de Analytik Jena AG.

Neste caso, o emprego da palavra comportamento está associado, de forma geral, ao sinal do analito obtido na presença de constituintes residuais da matriz e ao sinal do analito obtido a partir de soluções. Sendo assim, os modificadores químicos possuem a função de interagir com o analito ou com a matriz para causar um relativo retardamento ou uma aceleração da vaporização dos mesmos (comportamento térmico). No caso da técnica SS-GF MAS, muitas vezes o papel do modificador químico permanente, tem a função de inibir a interação do analito e/ou do reagente formador da molécula com o grafite da plataforma. Neste sentido, cabe destacar que os elementos do grupo II da tabela periódica (elementos bem empregados como formadores de moléculas diatômicas), uma vez que são bons formadores de carbetos (ORTNER *et al.*, 2002; VOLYNSKY, 2004). Elementos do grupo IV – VI da tabela periódica (i.e., Hf, Ta, Zr, e Nb) possuem forte tendência em formar carbetos refratários, cujos pontos de ebulição são por volta de 3500 °C, sendo estes elementos muito bem empregados como modificadores químicos permanentes em GF MAS (HUANG *et al.*, 2008; GLEISNER *et al.*, 2010).

Torna-se evidente que, embora algumas dificuldades estejam presentes no uso de SS, esta técnica de introdução de amostra, compõe quesitos suficientes para ser empregada em análises de rotina, agregando diversas características interessantes que facilitam seu uso, contornam dificuldades instrumentais e, principalmente, asseguram a exatidão do resultado analítico. O emprego da SS juntamente com a técnica MAS é, desta forma, o melhor caminho para a determinação de halogênios a partir de moléculas diatômicas formadas no GF. No entanto, este caminho deve ser suportado por sistemas que empregam corretores de fundo eficientes e capazes de assegurar que apenas o sinal do analito seja detectado, o que torna vantajoso o uso da técnica de HR-CS AAS/MAS. As revisões detalhadas sobre os corretores de fundo em HR-CS AAS/MAS foram publicadas por Borges *et al.* (BORGES *et al.*, 2005), Welz *et al.* (WELZ *et al.*, 2002; WELZ *et al.*, 2014) e Heitmann *et al.* (HEITMANN *et al.*, 2006).

A determinação de halogênios a partir de MAS associada a SS compõe uma boa estratégia analítica para tal finalidade. No entanto, a aplicação da SS-MAS dá ao analista uma informação quantitativa total dos constituintes presentes em uma amostra, não sendo possível diferenciar as respectivas espécies contidas no material. Quando a investigação quantitativa das espécies de um constituinte é necessária para um determinado estudo (e.i., toxicológico), a análise será denominada análise de especiação (TEMPLETON *et al.*, 2000). No caso

de halogênios, a concentração total do elemento tem sido suficiente para tomada de decisões utilizando SS-GF MAS enquanto que, no caso de metais como arsênio e mercúrio ou não-metais como o selênio, o conteúdo total da concentração não está necessariamente ligada à toxicidade dos mesmos, sendo necessária uma outra técnica que envolva separação prévia das espécies e posterior determinação utilizando uma técnica apropriada. Técnicas cromatográficas acopladas a detectores de massa têm sido muito bem empregadas para tal finalidade.

1.2 Determinação de arsênio total e análise de especificação de arsênio

O arsênio está entre os elementos que apresentam alta toxicidade, sendo o primeiro da lista dos elementos mais tóxicos segundo a *National Priorities List of the ATSDR* (ATSDR, 2007; REBELO *et al.*, 2016). O arsênio pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação e ligados a diferentes grupos orgânicos que, conseqüentemente, passam a apresentar diferentes graus de toxicidade (WHO, 2001; REBELO e CALDAS, 2016). As espécies inorgânicas de arsênio, As(III) e As(V), são as espécies que apresentam maior toxicidade comparadas às espécies orgânicas, sendo o As(III) de maior toxicidade quando comparado à espécie As(V). Dentre as espécies orgânicas comumente encontradas solúveis em água, o ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC), a toxicidade diminui em função do aumento de substituintes orgânicos ligados ao átomo de arsênio, sendo os dois últimos muito pouco tóxicos aos seres humanos (WHO, 2001; FLORA, 2015).

Em ambientes aquáticos o arsênio está presente em concentrações entre 1 e 170 mg kg⁻¹ enquanto que, em amostras de origem terrestre, não excedem 0,2 mg kg⁻¹ (FRANCESCONI, 2010). Estas concentrações podem sofrer alterações significativas dependendo das atividades antropogênicas e/ou da formação geológica do ambiente que se situa, pois compostos de arsênio ocorrem naturalmente em cinzas vulcânicas, rochas, minerais sulfurados, etc (REBELO e CALDAS, 2016). As maiores concentrações de arsênio em ambientes marinhos acabam, devido à bioacumulação, por refletir na alta concentração de arsênio em alimentos provenientes de animais aquáticos como peixes e frutos do

mar, os quais são fontes de alimento para os seres humanos e, conseqüentemente, as principais fontes de exposição.

Diferentes estudos em água têm relacionado o arsênio com diferentes doenças carcinogênicas causadas no ser humano após a exposição prolongada do mesmo, sendo as principais doenças causadas no trato urinário, pulmão, bexiga, pele e rim (FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; CHUNG, C.-J. *et al.*, 2013; CHUNG, Y.-L. *et al.*, 2013; TSUJI *et al.*, 2014; SABATH, 2015). São relatadas ainda doenças não carcinogênicas como infecções, diabetes e doenças neurológicas, estando esta última relacionada até mesmo com doença de Alzheimer e doença de Parkinson (ZIEROLD *et al.*, 2004; BARDACH *et al.*, 2015). Estima-se que na América Latina quatorze países, dentre eles o Brasil, enfrentam problemas de saúde vinculados às altas concentrações de arsênio, sendo a Argentina, o Chile e o México os principais países (FIGUEIREDO *et al.*, 2010; BARDACH *et al.*, 2015).

Desta forma, entender a química do arsênio no meio ambiente é uma estratégia interessante para avaliar os riscos inerentes à saúde humana quando exposta a uma determinada classe de compostos, cabendo ressaltar aqui as espécies de arsênio provenientes de peixes e organismos marinhos, principalmente as espécies lipofílicas (TALESHI *et al.*, 2008; RABER *et al.*, 2009; GARCÍA-SALGADO *et al.*, 2012; RAAB *et al.*, 2013; GARCÍA-SALGADO *et al.*, 2014; SELE *et al.*, 2014; PETURSDOTTIR *et al.*, 2016). No entanto, para entender o comportamento das espécies de arsênio é necessário isolá-las e identificá-las, sendo essa uma tarefa ignorada até as últimas décadas devido às dificuldades analíticas impostas até então

1.2.1.1 Espécies de arsênio lipossolúveis

As espécies de arsênio podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com a solubilidade das mesmas: (1) as espécies solúveis em água, tais como espécies catiônicas e aniônicas (i.e. MMA, DMA, AsB, AsC e arseno-açúcares) dependendo do potencial redox do meio (Eh) e pH; (2) as espécies lipossolúveis denominadas arsenolípídeos (AsLip), classe esta que inclui os ácidos graxos contendo arsênio (AsFA), fosfolípídeos contendo arsênio (AsPh) e hidrocarbonetos contendo arsênio (AsHC) (SCHMEISSER *et al.*, 2005; RUMPLER *et al.*, 2008; ARROYO-ABAD *et al.*, 2010; RUIZ-CHANCHO *et al.*, 2012; LISCHKA *et al.*, 2013; SELE *et al.*, 2013; ARROYO-ABAD *et al.*, 2016).

As espécies de AsLip são resultantes de processos de metilação denominadas biotransformação, que possui como rota principal a redução das espécies inorgânica As(V) pela glutatona ou outros tióis a espécie intermediária inorgânica As(III) com posterior metilação via enzimas metiltransferases (SCHMEISSER *et al.*, 2005; SCHMEISSER *et al.*, 2006), processos representados no esquema da Figura 2.

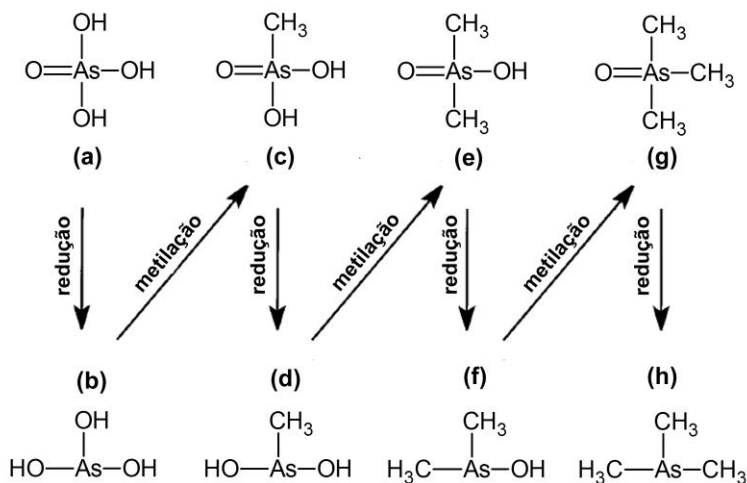
O processo de metilação de espécies de arsênio tem como finalidade a desintoxicação, pois acabam por converter espécies tóxicas de arsênio em espécies metabólicas de menor absorção, facilitando assim a excreção das mesmas. No caso de micro-organismos, fitoplânctons e algas, as espécies convertidas são estocadas e não eliminadas, permitindo que as concentrações das espécies aumentem ao longo da cadeia trófica devido à bioacumulação.

Ainda, na década de 1920, havia especulações sobre espécies de arsênio solúveis em frações lipídicas extraídas de algas, mariscos e crustáceos (CHAPMAN, 1926). No entanto, as espécies foram caracterizadas apenas como “arsênio orgânico” e não foram caracterizadas como tóxicas. Apenas em 1969, Lunde (LUNDE, 1968) investigou extratos provenientes de óleo de bacalhau e arenque extraídos a partir de uma mistura de clorofórmio/metanol (2/1) e analisadas por ativação neutrônica, especulando, pela primeira vez, a existência de espécies de AsPh. A primeira identificação de espécies de AsLip foi feita apenas 10 anos mais tarde por Morita e Shibata (MORITA *et al.*, 1988), os quais extraíram frações lipídicas de algas marrom utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (1/1), com posterior purificação utilizando uma mistura de hexano/acetoneitrila (1/1) e separação cromatográfica com sílica gel e clorofórmio/metanol (1/2) como eluente. As determinações foram feitas utilizando cromatografia gasosa, (GF) e ICP OES.

Ainda assim, o estudo de espécies de arsênio lipossolúveis permaneceu estacionado por mais de uma década, tendo um grande avanço apenas após o trabalho desenvolvido por Kovacevic *et al.* (KOVAČEVIČ *et al.*, 2004), os quais divulgaram um trabalho utilizando a injeção de solvente orgânico no plasma gerado na técnica de ICP-MS na análise de fosfolípidos provenientes de amostras biológicas. Este trabalho desafiou diferentes grupos de pesquisa envolvendo AsLip, possibilitando um grande salto na elucidação de

espécies lipossolúveis, pois agora, as espécies de arsênio poderiam ser separadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa (RP) e detectadas de forma sequencial utilizando uma técnica extremamente seletiva e de alta sensibilidade (ICP-MS). A técnica de espectrometria de massa com ionização electrosspray (ESI-MS) veio atribuir as características que faltavam para as elucidações estruturais das espécies de AsLip.

Figura 2. Mecanismos de redução das espécies de arsenato (a) para arsenito (b), com os posteriores produtos de metilação: ácido monometilarsônico (c), monometilarsina (d), dimetilarsínico (e), dimetilarsina (f), óxido de trimetialarsina (g) e trimetilarsina (h).



Fonte: Adaptado de Bentley e Chasteen (BENTLEY *et al.*, 2002).

1.2.1.2 Extração, identificação e elucidação estrutural de arsenolipídeos

O principal desafio em uma análise de especiação química de arsênio é a extração das espécies sem convertê-las em outras, o que poderia mascarar a concentração real da espécie de interesse na amostra e/ou impossibilitando a elucidação de sua estrutura química. De forma geral, a extração de espécies de AsLip está baseada na distribuição das espécies entre duas fases líquidas (amostras líquidas) ou na distribuição

das espécies entre uma fase sólida e uma fase líquida (amostras sólidas), cujas espécies lipossolúveis são extraídas por um solvente orgânico de caráter apolar ou de média polaridade.

A técnica de separação das espécies de arsênio geralmente é combinada com a técnica de determinação e, apesar de diferentes técnicas de separação serem aplicadas para separação de espécies solúveis em água, no caso de separação de AsLip as técnicas estão restritas à técnica de GC e à técnica de RP-HPLC. Estas duas técnicas de separação podem estar combinadas com diferentes detectores tais como detectores de massa (MS) (RUMPLER *et al.*, 2008; AMAYO *et al.*, 2011; ARROYO-ABAD *et al.*, 2013) e espectrometria de emissão atômica por plasma induzido por microondas (MIP-AES) (ARROYO-ABAD *et al.*, 2010).

1.2.1.3 Extração das espécies lipídicas de arsênio

Sele *et al.* (SELE *et al.*, 2013) descreveram a determinação de AsHC em diferentes amostras de óleo de peixe (arenque e anchova) utilizando a partição dos analitos entre hexano e uma mistura de água/metanol (9/1, v/v); a fração de menor polaridade foi submetida a uma etapa de limpeza utilizando extração em fase sólida (SPE) com posterior eluição dos analitos utilizando uma mistura de metanol/clorofórmio/água (60/30/8, v/v/v). A nova fração purificada foi redissolvida em hexano para identificação das espécies por GC acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS e GC-qTOF-MS). Neste trabalho foram identificados majoritariamente três espécies de AsHC ($C_{17}H_{38}AsO$, $C_{19}H_{42}AsO$, $C_{23}H_{38}AsO$) com concentrações entre 5,9 e 8,7 mg kg⁻¹.

Rumpler *et al.* (RUMPLER *et al.*, 2008) também utilizaram a mistura de hexano e água/metanol (1/9, v/v), porém para extração de AsFA presentes em amostras de óleo de fígado de bacalhau. O extrato de menor polaridade foi submetido a uma etapa de limpeza utilizando uma coluna preparativa por exclusão de tamanho e a separação e identificação utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS. Com este procedimento foi possível extrair e identificar seis espécies de AsFA, as quais representaram 20% da concentração total de arsênio contida nas amostras de óleo de fígado de bacalhau.

Procedimentos que envolvem subsequentes etapas de purificação empregando cromatografia em fase normal (sílica gel) e a combinação de diferentes solventes orgânicos para purificação e eluição das espécies de arsênio também têm sido demonstrados. Amayo *et al.* (AMAYO *et al.*, 2014) fizeram a extração e purificação de dezesseis espécies de AsLip em amostras de óleo de fígado de bacalhau. Para isto Amayo *et al.* utilizaram 10 g de amostra de óleo com posterior extração com água para remoção de constituintes hidrossolúveis, ao passo que a fase remanescente hidrofóbica foi redissolvida em hexano com adição de sílica gel e secagem. O conjunto óleo + sílica foi então transferido para uma coluna de vidro e um gradiente de hexano, acetato de etila e metanol (300 mL) foi utilizado para purificação e eluição das espécies de AsLip. As frações resultantes foram secas, dissolvidas em metanol e analisadas por HPLC-ICP-MS/ESI-MS. Utilizando esta estratégia foi possível a identificação de doze espécies de AsLip, sendo dez espécies de AsFA e duas espécies de AsHC, além de constatar que produtos de degradação estavam sendo gerados durante as etapas de purificação.

Estratégia similar também foi adotada por Arroyo-Abad *et al.* (ARROYO-ABAD *et al.*, 2010) na extração e purificação de AsHC provenientes de amostras de tecido de fígado de bacalhau. Arroyo-Abad *et al.* também fizeram uso de uma coluna de sílica gel como fase estacionária e gradiente de acetato de etila/metanol em diferentes proporções para posterior análise por GC-ICP-MS e GC-MIP-AES. A partir da análise das doze frações resultantes foi possível a identificação majoritária de três espécies de AsHC, sendo elas $C_{17}H_{37}AsO$, $C_{19}H_{41}AsO$ e $C_{23}H_{37}AsO$.

Apesar de laboriosa, o uso de colunas preparativas de fase normal com gradiente de força de eluição a partir de solventes de baixa, média e alta polaridade têm se mostrado a melhor estratégia para purificação de extratos contendo espécies de AsLip, principalmente por possibilitarem a separação de compostos de alta similaridade com as espécies de arsênio como é o caso dos fosfolipídeos. Os fosfolipídeos possuem semelhança estrutural com os AsLip e, conseqüentemente, se mostram como potenciais interferentes na etapa de identificação principalmente quando a técnica de ESI-MS é utilizada.

1.2.1.4 Análise de especiação de arsenolipídeos utilizando RP-HPLC-ICP-MS

A técnica de HPLC tem sido aplicada para a separação cromatográfica de espécies químicas de vários elementos (MORITA e SHIBATA, 1988; SCHMEISSER *et al.*, 2005; BIERLA *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-RODAS *et al.*, 2016). Sua ampla aplicação está no fato de ser compatível com um grande número de técnicas de detecção (hifenação) sendo a técnica de ICP-MS um dos principais acoplamentos. Além disso, a HPLC não depende da estabilidade térmica do analito (mais versátil quando comparada com a técnica de GC) e apresenta um grande número de fases estacionárias (fases estacionárias sólidas e líquidas) as quais podem ser empregadas de acordo com as características do analito (cromatografia de exclusão, bioafinidade, por par iônico, fase reversa, etc) (COLLINS *et al.*). Esta última, RP- HPLC, está entre as técnicas de separação mais bem consolidadas para análise de especiação de AsLip, espécies que possuem maior caráter apolar devido as longas cadeias de carbono que compõem a estrutura lipídica.

A técnica de ICP-MS por sua vez é totalmente compatível com a técnica HPLC e apresenta ainda algumas vantagens quando comparada com técnicas comumente empregadas em análise elementar, como a técnica de AAS ou ICP OES. Dentre as principais vantagens estão os baixos LOD alcançados, possibilidade de análises isotópicas de diferentes elementos químicos, capacidade multielementar e interferência mínima da matriz devido às altas temperaturas alcançadas pelo plasma (entre 6 000 e 10 000 K). Em contrapartida, é uma técnica relativamente onerosa devido ao alto custo de manutenção, o que restringe em parte a aplicabilidade da técnica seja em análise de especiação ou análise elementar.

No entanto, a técnica de ICP-MS também apresenta algumas desvantagens, podendo, por exemplo, sofrer interferências espectrais tais como íons de carga dupla, interferência poliatômica, isobárica e formação de íons de óxidos refratários. Pode ainda sofrer interferências não espectrais, sendo, a mais comum, a deposição de resíduo sobre os cones de amostragem dependendo do carbono residual da amostra. A presença de outro elemento facilmente ionizável e efeito espaço carga

também são exemplos de interferências não espectrais, entretanto, diversas estratégias podem ser abordadas a fim de contornar tais efeitos (JARVIS *et al.*; THOMAS, 2001).

Taleshi *et al.* (TALESHI *et al.*, 2014) investigou onze espécies de AsLip provenientes de amostras de óleo de peixe *Micromesistius poutassou* a partir de separações cromatográficas utilizando uma coluna de C₁₈ Atlantis (150 x 1,0 mm, 5 µm) e fase móvel formada pela mistura de 10 mmol L⁻¹ de NH₄OAc (pH 6,0) e etanol em modo gradiente para detecção por ICP-MS/ESI-MS. Neste trabalho, Taleshi *et al.* concluíram que 30% da concentração total de AsLip provenientes da amostra de óleo poderia estar na forma de ácidos carboxílicos conjugados, presumidamente ésteres que foram hidrolisados quando coluna preparativa de fase normal foi empregada para purificação de extratos lipídicos.

De forma semelhante, Amayo *et al.* (AMAYO *et al.*, 2013) separaram e identificaram vinte espécies de AsLip em óleo de peixe (*Mallotus villosus*), entre elas AsFA e AsHC, utilizando coluna de fase reversa (Agilent Eclipse, XBD C₁₈, 4,8 x 150 mm) e gradiente de 0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em metanol. As espécies foram detectadas por ICP-MS/ESI-MS. Amayo *et al.* ainda propuseram uma nova classe de alcoóis graxos de arsênio (MAsFOH) a partir de etapas de derivatização química por acetilação.

1.2.1.5 Análise de especiação de arsênio via RP-HPLC-ESI-MS

Enquanto a técnica de ICP-MS permite a determinação de elementos em uma amostra, a técnica de ESI-MS disponibiliza a informação molecular das espécies orgânicas de modo que a estrutura pode ser elucidada a partir de combinações de técnicas, sendo os acoplamentos HPLC-ICP-MS os mais comuns. O íon neste caso é gerado a partir da aplicação de um forte campo elétrico sobre gotículas nebulizadas a partir de um *spray* da solução e as espécies orgânicas introduzidas no analisador de massas. A técnica de ESI-MS apresenta ainda, além da disponibilização de estruturas intactas de moléculas, vantagens como alta sensibilidade e alta resolução (podendo ser aplicada para massas entre 100 000 e 200 000 com boa exatidão) (MAKAROV, 2000; HU *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo inicial compreendeu o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de flúor, cloro e bromo por HR-CS GF MAS utilizando como forma de introdução de amostras a SS. Os métodos desenvolvidos visam a determinação destes elementos de forma rápida e confiável em diferentes amostras complexas, tais como carvão e material biológico, com mínimo preparo de amostras.

O objetivo geral da segunda parte consistiu no desenvolvimento de metodologia para a determinação de arsênio total em óleo de peixe utilizando HR-CS GF AAS e análise direta bem como na identificação de novas espécies de AsFA e AsHC utilizando RP-HPLC-ICP-MS e identificação simultânea com ESI-MS.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos no desenvolvimento das metodologias para a determinação de flúor, cloro e bromo incluíram:

Avaliar os espectros moleculares das moléculas CaF e CaBr utilizando soluções padrão.

Estimar o espectro de absorção da molécula SrCl utilizando cálculos teóricos baseados na teoria do funcional da densidade dependente do tempo, TD-DFT.

Avaliar experimentalmente o espectro da molécula SrCl utilizando soluções padrão.

Investigar o efeito das temperaturas de pirólise e de vaporização na estabilidade das moléculas formadas em GF.

Investigar o emprego de modificadores químicos permanentes bem como o uso de modificadores em solução adicionados sobre a amostra.

Avaliar o emprego da SS a partir do estudo sistemático dos programas de temperaturas de pirólise e vaporização.

Avaliar a estratégia de separar a solução formadora da amostra na determinação de bromo em amostras de carvão.

Investigar o efeito da concentração dos reagentes formadores na estabilidade das moléculas diatômicas formadas em GF.

Determinar os parâmetros de mérito, tais como limite de detecção, massa característica, faixa linear de trabalho e exatidão para cada metodologia proposta.

Aplicar as metodologias validas em diferentes amostras de carvão e amostras biológicas.

Para os estudos envolvendo determinação de arsênio total por HR-CS GF AAS e a especiação de arsênio via RP-HPLC-ICP-MS/ESI-MS, os objetivos específicos foram:

1) Determinação de arsênio total utilizando HR-CS GF AAS:

Investigar o programa de temperatura (pirólise e atomização) adequado às determinações de arsênio total a partir de soluções padrão.

Investigar o emprego de modificadores químicos permanentes bem como o uso de modificadores em solução

Avaliar a viabilidade do uso direto de amostras de óleo de peixe diluídas apenas com 1-propanol para a determinação total de arsênio.

Investigar o programa de temperatura utilizando amostras de óleo de peixe diluídas com 1-propanol.

Determinar os parâmetros de mérito, tais como limite de detecção, massa característica, faixa linear de trabalho e exatidão para o método desenvolvido.

Avaliar a exatidão do método proposto comparando os resultados encontrados utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas com determinação por ICP-MS.

Aplicar a metodologia em diferentes amostras de óleo de peixe.

2) Análise de especiação de arsênio utilizando RP-HPLC-ICP-MS/ESI-MS:

Efetuar a extração sequencial das espécies de arsênio utilizando diferentes porções de solventes orgânicos e água.

Determinar a concentração de arsênio total em cada extrato proveniente da extração sequencial utilizando ICP-MS.

Efetuar o fracionamento e purificação das espécies de arsênio utilizando cromatografia em fase normal.

Efetuar a separação e quantificação das espécies de arsênio provenientes de cada extrato purificado utilizando RP-HPLC-ICP-MS.

Identificar as espécies de arsênio provenientes da RP-HPLC utilizando ICP-MS/ESI-MS.

PARTE 1 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FLÚOR, CLORO E BROMO POR HR-CS GF MAS E ANÁLISE DIRETA DE AMOSTRAS SÓLIDAS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Para as medidas de absorção molecular foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua contrAA 600 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), com aquecimento transversal do tubo de grafite e equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio, a qual emite um espectro de alta intensidade na região do UV-Vis (180 – 900 nm). O compartimento óptico consiste de um duplo monocromador: um prisma pré-monocromador e um monocromador com rede *echelle* responsável pela alta resolução ($\lambda/\Delta\lambda \approx 140\,000$) e um detector CCD linear com 588 pixels, dos quais 200 são utilizados para os propósitos analíticos. A instrumentação envolvendo este equipamento tem sido bem discutida por Welz *et al.* (WELZ *et al.*, 2014).

Para as otimizações e determinações a partir de soluções padrão foram utilizados tubos de grafite recobertos piroliticamente contendo plataformas de grafite integradas (Analytik Jena, 407-A81.025). Para as análises utilizando amostras sólidas, foram utilizados tubos de grafite recobertos piroliticamente sem plataformas, mas com orifício de dosagem (Analytik Jena, 407-A81.011). As amostras sólidas foram pesadas diretamente em plataformas de grafite (Analytik Jena, 407-152.023) utilizando uma microbalança M2P (Sartorius, Alemanha) e introduzidas no tubo de grafite utilizando um sistema manual SS6 (Analytik Jena).

As soluções foram pipetadas manualmente no tubo ou na plataforma de grafite utilizando micropipetas ou utilizando um sistema automático S60 (Analytik Jena) de introdução de amostras. As medições de absorbância para as

moléculas CaF, SrCl e CaBr foram feitas utilizando os comprimentos de onda em 606,440 nm, 635,863 nm e 625,315 nm, respectivamente, utilizando a absorvância integrada do volume de 3 pixels (absorvância selecionada do volume do pico, PVSA, $A_{\Sigma 3, \text{int}}$) (HEITMANN *et al.*, 2007).

Para cada molécula foram estudados os programas de temperaturas envolvendo pirólise e vaporização, os quais estão demonstrados nos seus respectivos itens que descrevem a otimização do método. Previamente às determinações a plataforma para amostras sólidas foi recoberta com 400 μg (10 injeções de 40 μL das soluções contendo 1 g L^{-1}) dos modificadores permanentes paládio, irídio, zircônio ou rutênio utilizando o programa de aquecimento mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Programa de temperatura utilizado para a deposição dos modificadores químicos permanentes na plataforma de grafite para a determinação de flúor, cloro e bromo por HR-CS GF MAS.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	Permanência (s)
1	110	5	20
2	120	5	20
3	300	30	20
4	1000	50	10
5	2000	100	4

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 2 estão mostrados os programas de temperatura utilizados para todas as determinações de flúor, cloro e bromo nas diferentes amostras de carvão e tecido biológico utilizando HR-CS SS-GF MAS a partir de curvas de calibração feitas utilizando solução padrão. A taxa de vazão de argônio foi fixada em 2,0 L min^{-1} em todas as etapas de aquecimento exceto na etapa de vaporização, o qual foi desligado neste estágio.

Como forma de avaliação de exatidão dos métodos propostos para a determinação de cloro e bromo em amostras biológicas e amostras de carvão, os resultados foram comparados com os resultados encontrados utilizando SS-ETV-ICP-MS. Para isso, as medidas foram feitas com um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado Elan 6000, equipado com um vaporizador eletrotérmico HGA-600 MS (Perkin-ElmerSCIEX, Canadá) (GROBENSKI *et al.*, 1982). As amostras foram pesadas diretamente em um capilar de vidro para amostras sólidas utilizando microbalança modelo M2P (Sartorius, Alemanha) e transferidas manualmente para o tubo de grafite recoberto piroliticamente (Perkin-Elmer, EUA). Os parâmetros operacionais que foram utilizados para as determinações de cloro e bromo por SS-ETV-ICP-MS estão listados na Tabela 4. Argônio com pureza mínima de 99,996% (White Martins, Brasil) foi utilizado para a geração do plasma, como gás carreador e gás interno.

Tabela 2. Programas de temperaturas utilizados para a determinação de flúor, cloro e bromo por HR-CS GF MAS a partir de soluções padrão ou análise direta de amostras sólidas.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Permanência (s)
Secagem 1	110 (F,Cl), 90 (Br)	30 (F, Cl), 3 (Br)	20
Secagem 2	120 (F,Cl), 110 (Br)	50 (F, Cl), 5 (Br)	20
Pirólise	700 (F), 600 (Cl), 800 (Br)	100 (F, Cl), 40 (Br)	10
Vaporização	2100 (F), 2300 (Cl), 2200 (Br)	3000	5
Limpeza	2300 (F), 2400 (Cl, Br)	1000	4

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3. Parâmetros operacionais utilizados nas determinações de cloro e bromo por SS-ETV-ICP-MS.**ICP-MS**

Radio frequência		1300 W
Fluxo de gás		
	Principal	15,0 L min ⁻¹
	Intermediário	1,2 L min ⁻¹
	Carregador	0,7 L min ⁻¹
Cones	Amostra/ <i>skimmer</i>	Pt
Medida do sinal		Área do pico
Repetições por leituras		380
Replicatas		1
Tempo de espera		15 ms
Voltagem do detector		
	Pulso	1250 V
	Analógico	-2287 V
	Tempo morto	50 ns
Isótopos monitorados	³⁵ Cl, ⁷⁹ Br	

SS-ETV

Etapa	Cloro	Bromo
Secagem	100 °C por 10 s	100 °C por 10 s
Pirólise	600 °C por 10 s	300 °C por 12 s
Vaporização	1800 °C	2200 °C
Limpeza	2000 °C	2300 °C

Fonte: adaptado de (GOIS *et al.*, 2014).

3.2 Reagentes e materiais de referência certificados

Para o preparo das soluções de calibração e otimização foi utilizada água ultrapura com resistividade de 18 M Ω cm, obtida de um sistema de purificação de modelo Mega ROUP (Equisul, Brasil). Soluções estoques de flúor, cloro e bromo com concentrações de 1 g L⁻¹, foram preparadas dissolvendo quantidades apropriadas dos sais KF (Sulfal, Brasil), NaCl (Fluka, Suíça) e KBr (Fluka), respectivamente, em água ultrapura. Como reagentes formadores das moléculas CaF, CaBr e SrCl, as soluções utilizadas foram: solução 10 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹ de Ca²⁺, preparadas dissolvendo quantidades apropriadas do sal Ca(NO₃)₂·4H₂O (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) em ácido acético (Vetec) 5% (v/v), para as determinações de flúor e bromo, respectivamente; solução estoque contendo 10 g L⁻¹ de Sr²⁺ preparada a partir da dissolução apropriada do sal SrCO₃ (Vetec) em ácido acético 5% (v/v). Zircônio (Fluka), rutênio (Sigma-Aldrich, EUA) e paládio (Fluka), com concentrações de 1 g L⁻¹, foram utilizados como modificadores químicos.

Os CRM de carvão utilizados para o desenvolvimento das metodologias e validação dos métodos foram: NIST 1632b “carvão betuminoso”; NIST 1630a “trações de Hg em carvão”; NIST 1635 “elementos traço em carvão” da National Institute of Standards and Technology (NIST, EUA); SARM 18 “Carvão de Witbank” e SARM 20 “carvão de Sasolburg” da South African Bureau of Standards (SABS, África do Sul); BCR 40 “carvão”, BCR 180 “carvão combustível”, BCR 181 “carvão metalúrgico”, BCR 182 “carvão térmico” provenientes da Community Bureau of Reference (BCR, Bélgica). Os seguintes materiais biológicos certificados foram: BCR 186 “fígado de porco”, BCR 278R “tecido de mexilhão” (BCR); NIST 1567a “farinha de trigo”, NIST 1577b “fígado bovino” e NIST RM 8414 “músculo bovino” (NIST); NCS ZC 71001 “fígado bovino” provenientes da National Analysis Center for Iron and Steel (NACIS, China).

3.3 Procedimento para a determinação de flúor por HR-CS SS-GF MAS em amostras de carvão

Aproximadamente 0,7 mg de amostra de carvão foram pesadas diretamente na plataforma de grafite SS recoberta previamente com 400 µg de modificador químico permanente e nesta foram adicionados 10 µL da solução formadora da molécula Ca^{2+} 10 g L^{-1} . A plataforma contendo a amostra foi então inserida manualmente no tubo de grafite para ser submetida ao programa de aquecimento mostrado na Tabela 3. Em alguns experimentos, 10 µL da solução de paládio ou a mistura de paládio/magnésio foram adicionados sobre a amostra para avaliar o aumento de sensibilidade. A curva de calibração foi feita utilizando padrão em solução pipetados diretamente na plataforma SS e submetidos ao mesmo programa descrito previamente para as amostras.

3.4 Procedimento para a determinação de cloro por HR-CS SS-GF MAS em amostras biológicas

Neste caso, a plataforma de grafite SS foi previamente recoberta com zircônio ou paládio como modificadores químicos permanentes (programa de aquecimento da Tabela 2) e em seguida foram pesadas nessas plataformas massas entre 0,05 - 0,5 mg de amostras biológicas. Então, foram adicionados 10 µL de solução formadora da molécula Sr^{2+} 10 g L^{-1} (correspondendo a 100 µg de Sr^{2+}) e a plataforma de grafite SS foi inserida manualmente no tubo de grafite para a etapa de aquecimento descrito na Tabela 3. A curva de calibração foi obtida utilizando padrões em solução pipetados diretamente na plataforma de grafite SS recoberta com o modificador químico permanente e submetidos ao mesmo programa de aquecimento otimizado com amostras sólidas.

3.5 Procedimento para a determinação de bromo por HR-CS SS-GF MAS em amostras de carvão

A solução formadora da molécula Ca^{2+} foi pipetada diretamente sobre a amostra de carvão ou pipetada diretamente no tubo de grafite sem contato com a amostra. No segundo caso, as amostras de carvão (\approx 0,2 - 3 mg) foram pesadas diretamente na plataforma de grafite SS, inicialmente tratada com modificador químico permanente (zircônio, rutênio ou paládio) e inserida no tubo de grafite para a etapa de aquecimento utilizando o programa de temperatura descrito na Tabela 2. A avaliação do efeito de paládio ou mistura paládio/magnésio na

sensibilidade do método foi avaliada adicionando-se 10 μL das respectivas soluções sobre a amostra de carvão para a determinação. As curvas de calibração também foram construídas utilizando padrões em solução pipetados diretamente na plataforma de grafite SS utilizando mesmo programa de temperatura que as amostras.

3.6 Procedimentos para a determinação de cloro e bromo por SS-ETV-ICP-MS em amostras biológicas e amostras de carvão

Aproximadamente 0,5 mg de amostra foram pesadas e transferidas para o copo de amostragem sólida e submetidas ao programa de aquecimento descrito na Tabela 4. A curva de calibração utilizada para a determinação de cloro e bromo utilizando SS-ETV-ICP-MS foi estabelecida utilizando material sólido de referência certificado RM 8414 e BCR 182 para cloro e bromo, respectivamente, com massas variando entre 0,1 e 1,5 mg de amostra. Os procedimentos de validação dos dois métodos de comparação que faz uso do SS-ETV-ICP-MS para a determinação de cloro e bromo em amostras biológicas e carvão foram otimizados e validados previamente por de Gois *et al.* (GOIS *et al.*, 2014; 2015).

3.7 Fórmulas utilizadas para o cálculo de LOD, LOQ e massa característica

Para todos os métodos desenvolvidos nesta primeira parte, o LOD e o LOQ foram calculados como 3 e $10\sigma/S$ ($n = 10$), respectivamente, onde σ é o desvio padrão de 10 medidas do branco e S é a medida de inclinação da curva de calibração obtida a partir de soluções aquosas. A massa característica (m_0) foi estimada como sendo a massa do analito capaz de causar uma absorvância integrada correspondente a 0,0044 s e foi calculada como sendo $A_{\text{int}} = 0,0044 \text{ s/S}$.

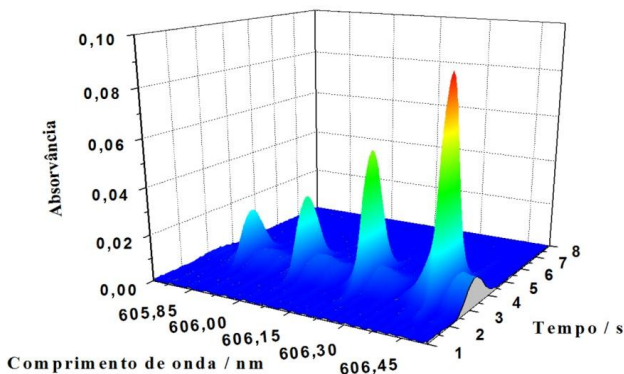
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de flúor em amostras de carvão

4.1.1 Estudo da região espectral de trabalho

Dentre os halogênios, o flúor é o elemento que apresenta maior capacidade de formar moléculas de alta energia de dissociação (moléculas com energias de dissociação maiores que 500 kJ mol^{-1}), as quais são mais apropriadas para o estudo da MAS (DITTRICH *et al.*, 1986). A molécula diatômica CaF apresenta energia de dissociação de 529 kJ mol^{-1} e tem sido muito bem empregada para a determinação de flúor em diferentes amostras injetadas na forma líquida (MORÉS *et al.*, 2011; BORGES *et al.*, 2014; OZBEK *et al.*, 2014), apresentando forte absorção na região espectral entre 605,7 nm e 606,5 nm, com máxima absorção em 606,432 nm devido à transição eletrônica $X^2\Sigma^+ - A^2\Pi$ (Figura 3).

Figura 3. Espectro de absorção resolvido temporalmente para a molécula CaF na faixa entre 605,7 nm e 606,5 nm. Condições: 30 ng de flúor (6 μL de uma solução de 5 mg L^{-1}) e adição de 10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} ; plataforma recoberta com 400 μg de zircônio como modificador permanente; temperatura de vaporização de $2100 \text{ }^\circ\text{C}$.

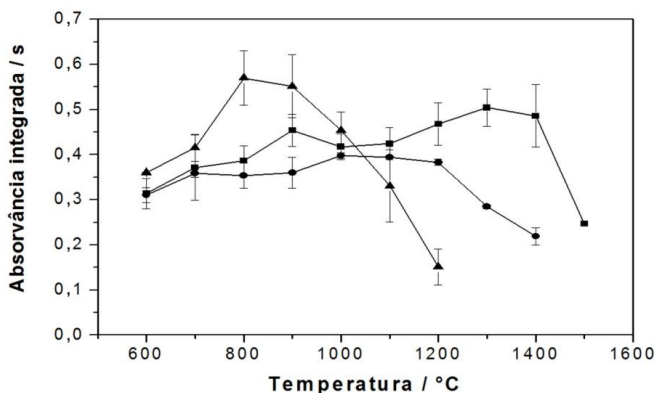


Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

4.1.2 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões em solução

As curvas de pirólise e vaporização foram estabelecidas com a finalidade de encontrar a maior temperatura de pirólise sem decréscimo do sinal analítico (perda devido à volatilidade) e a mínima temperatura necessária para que as condições térmicas de formação molecular em fase gasosa fossem alcançadas. Para tanto, também foi avaliado o efeito dos modificadores químicos permanentes paládio e irídio (Figura 4) com o objetivo de inibir a interação de Ca^{2+} com a superfície do tubo de grafite, prevenindo assim a formação de carbeto de cálcio (CaC_2) e ainda estabilizando a molécula CaF na etapa de vaporização.

Figura 4. Curvas de pirólise obtidas para a molécula CaF utilizando solução aquosa contendo 30 ng de flúor ($6 \mu\text{L}$ de uma solução de 5 mg L^{-1}) e adição de $10 \mu\text{L}$ de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} ; temperatura de vaporização de $2100 \text{ }^\circ\text{C}$; plataformas recobertas com $400 \mu\text{g}$ de irídio (■) ou paládio (●) como modificadores permanentes e plataforma sem recobrimento (▲). Cada ponto e barra de erros representam a média de três medidas e o desvio padrão de $n=3$.



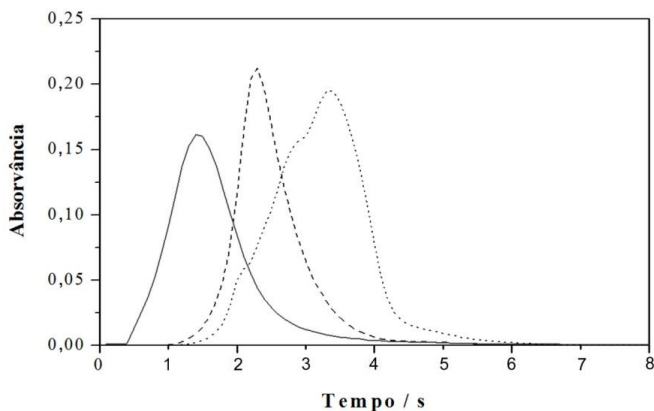
Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

Elementos do grupo da platina (grupo ao qual paládio e irídio pertencem) são conhecidos por penetrarem na microestrutura de

plataformas e tubos e formarem uma rede de compostos de intercalação com o grafite pirolítico (ORTNER *et al.*, 2002) reduzindo a reatividade dele.

Como pode ser observado a partir da Figura 4, quando paládio ou irídio são empregados, temperaturas acima de 1000 °C podem ser utilizadas sem perda de sensibilidade. No entanto, quando a plataforma sem o modificador permanente é utilizada a máxima temperatura alcançada sem perda de sensibilidade é em torno de 800 °C. Notáveis ainda são os maiores desvios encontrados quando irídio é utilizado comparado aos experimentos envolvendo paládio como modificador químico permanente. Plataforma sem modificador químico demonstrou maior sensibilidade comparado aos modificadores paládio e irídio; no entanto, os sinais analíticos foram distorcidos (Figura 5), prejudicando a repetitividade dos sinais analíticos.

Figura 5. Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaF. Condições: 30 ng de flúor (6 µL de uma solução de 5 mg L⁻¹) e adição de 10 µL de solução de Ca²⁺ 10 g L⁻¹; temperatura de pirólise de 1100 °C para paládio (linha sólida) e irídio (linha tracejada), e temperatura de pirólise de 800 °C para plataforma sem modificador (linha pontilhada). Para todos os experimentos foi utilizada a temperatura de vaporização de 2200 °C.



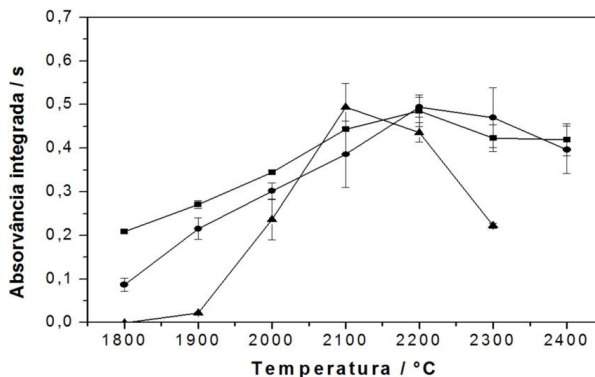
Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

Ainda em relação à Figura 5, outra observação pode ser feita ao fazer a comparação entre os tempos de vaporização da molécula CaF

quando formada em presença dos modificadores permanentes e na ausência deles. Quando modificadores foram empregados, a molécula CaF absorveu no primeiro segundo de vaporização. Porém, quando a plataforma sem modificador foi utilizada, a molécula passou a absorver após o primeiro segundo de vaporização. Esse deslocamento demonstra que os modificadores químicos permanentes inibem a interação da superfície de grafite com os reagentes, sendo o paládio o mais eficiente nesta função.

Em relação às curvas de vaporização, temperaturas ótimas foram encontradas em torno de 2200 °C para os modificadores permanentes paládio e irídio enquanto que, para plataforma sem recobrimento, a temperatura ótima de vaporização não excedeu 2100 °C (Figura 6).

Figura 6. Curvas de vaporização para a molécula CaF obtida a partir de 30 ng de flúor (6 µL de uma solução 5 mg L⁻¹) e adição de 10 µL de solução de Ca²⁺ 10 g L⁻¹; temperatura de pirólise de 1100 °C para paládio (●) ou irídio (■), e temperatura de pirólise de 800 °C para plataforma sem modificador (▲). Cada ponto e barra de erros representa a média de três medidas e o desvio padrão de n = 3.



Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

Foi observado também que na ausência de modificadores químicos permanentes o sinal analítico continuou sofrendo distorções mesmo em diferentes temperaturas de vaporização devido,

possivelmente, às interações entre o carbono da plataforma e os reagentes adicionados.

Essas distorções contribuíram significativamente para a baixa repetitividade dos experimentos nessas condições experimentais. A adição da mistura de paládio/magnésio em cada condição de máxima absorvância nas curvas de pirólise e vaporização utilizando paládio, irídio e plataforma sem recobrimento não demonstrou efeito significativo na intensidade dos sinais ou nos perfis analíticos.

4.1.3 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para SS

Levando em consideração o pequeno número de trabalhos envolvendo SS, buscou-se estudar o comportamento da molécula CaF na determinação de flúor em matrizes sólidas de alta complexidade, sem utilizar métodos de preparo de amostra.

Para este fim, o comportamento da molécula CaF na determinação de flúor em amostras de carvão foi estudado utilizando os dois modificadores químicos permanentes avaliados previamente (item 4.1.2). Nas Figuras 7 A-C estão demonstrados os sinais analíticos obtidos para temperaturas de pirólise de 700 °C, 800 °C e 900 °C, respectivamente, utilizando CRM de carvão NIST 1632b, pesado em plataforma recoberta com paládio, irídio ou plataforma sem recobrimento. Todos os perfis analíticos obtidos para a determinação de flúor utilizando SS mostraram significativa dependência da temperatura de pirólise investigada, os quais, em sua maioria, apresentaram “ombros”, distorções e até mesmo picos duplos quando a temperatura foi aumentada para 800 °C e 900 °C.

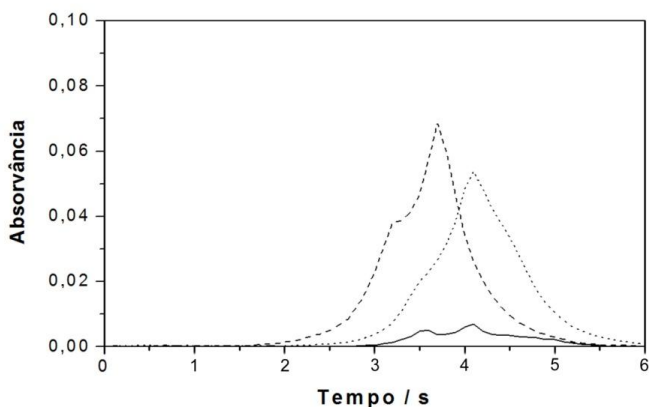
Dentre os sinais analíticos, aqueles provenientes do uso de plataformas de grafite sem recobrimento (Figura 7A), foram os que apresentaram maiores distorções para as três temperaturas de pirólise estudadas (faixa entre 700 °C e 900 °C). A interação do Ca^{2+} com o carbono da plataforma de grafite somado à alta concentração de carbono presente na amostra de carvão pode ser a possível explicação para a baixa eficiência de vaporização da molécula CaF, pois parte do cálcio é convertido em carbetto de cálcio e não fica disponível para formação e estabilização da molécula.

A mesma situação é repetida quando a plataforma de grafite é recoberta com irídio como modificador permanente (Figura 7B) independente da faixa de temperatura de pirólise avaliada. O único experimento que apresentou resultado satisfatório para a formação da molécula CaF foi aquele em que paládio foi utilizado como modificador

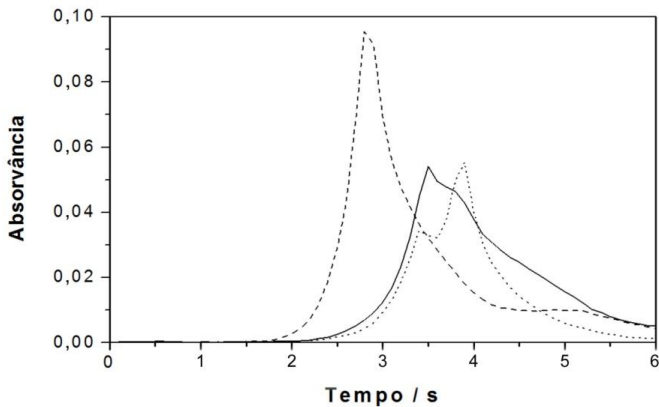
permanente com temperatura de pirólise em torno de 700 °C (Figura 7C). Acima de 800 °C são observados duplos picos nas duas condições avaliadas (800 °C e 900 °C), o que favorece o aumento da absorvância integrada para uma mesma massa de flúor, causando um falso positivo nas determinações. Desta forma, a temperatura de pirólise de 700 °C foi fixada para os estudos posteriores envolvendo curvas de vaporização.

Figura 7. Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaF formada a partir de 0,7 mg de amostra de carvão (NIST 1632b) e 10 µL de solução de Ca^{2+} 10 g L⁻¹ adicionados em: plataforma de grafite (A) sem recobrimento; (B) contendo irídio como modificador permanente; e (C) contendo paládio como modificador permanente. Os perfis analíticos representam as temperaturas de pirólise de 700 °C (linha sólida), 800 °C (linha tracejada) e 900 °C (linha pontilhada). Temperatura de vaporização de 2200 °C.

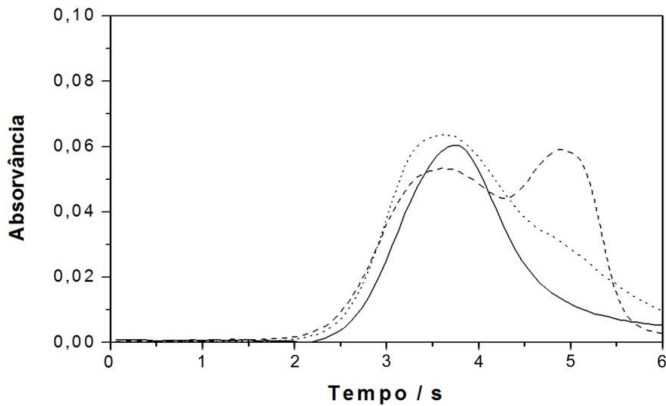
A



B



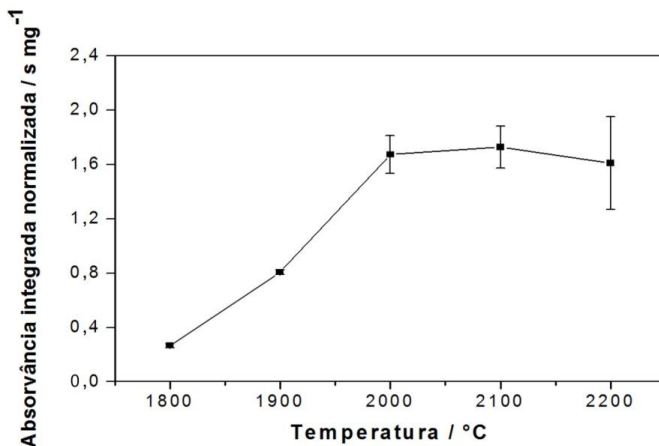
C



Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

A partir da condição pré-fixada utilizando 700 °C como temperatura ótima de pirólise, foi possível avaliar o efeito da temperatura de vaporização na sensibilidade da molécula CaF formada em fase gasosa. Os experimentos estão demonstrados na Figura 8.

Figura 8. Curva de vaporização para a molécula CaF gerada em GF utilizando SS de amostras de carvão (NIST 1632b, aproximadamente 0,7 mg), paládio como modificador químico permanente e 10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} . Temperatura de pirólise fixada em 700 $^{\circ}\text{C}$; n = 3.



Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

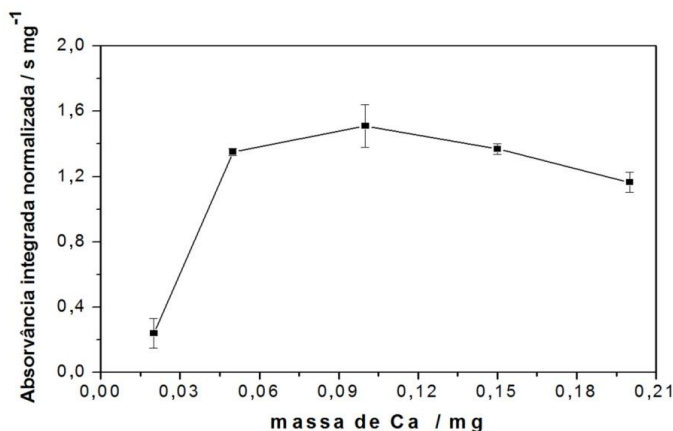
A máxima sensibilidade foi obtida quando foram utilizadas temperaturas na faixa entre 2000 $^{\circ}\text{C}$ e 2200 $^{\circ}\text{C}$, sendo selecionada a temperatura de vaporização de 2100 $^{\circ}\text{C}$ por estar em uma região ótima intermediária. Em temperaturas de vaporização de 2200 $^{\circ}\text{C}$ é possível observar um aumento significativo do desvio padrão (em torno de 20%), possivelmente devido à dissociação da molécula CaF e/ou processos de difusão devido à alta temperatura.

4.1.4 Otimização da massa do reagente formador da molécula

A massa do reagente formador da molécula possui influência direta na sensibilidade da molécula CaF formada em forno de grafite. Embora cálcio funcione neste caso predominantemente como reagente formador da molécula, parte dele pode formar

diferentes compostos voláteis com constituintes da matriz (carvão), principalmente compostos como CaC_2 formado em temperaturas entre 1800 °C e 2100 °C (ALBAIGÉS, 2013). Desta forma, buscou-se avaliar o comportamento da molécula CaF quando adicionadas concentrações entre 0,02 mg e 0,2 mg Ca^{2+} a partir de uma solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} (Figura 9).

Figura 9. Correlação entre a massa de Ca^{2+} e absorvância integrada normalizada obtida a partir de $\approx 0,7$ mg de amostra de carvão (NIST 1632b). Temperaturas de pirólise e vaporização de 700 °C e 2100 °C, respectivamente. Média e SD obtidos utilizando $n = 3$.



Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

É possível observar que a sensibilidade da molécula CaF aumenta significativamente quando as concentrações de Ca^{2+} são aumentadas de 0,02 mg a 0,05 mg de Ca^{2+} e alcança a máxima sensibilidade ao se utilizar 0,1 mg de Ca^{2+} , decrescendo posteriormente com o aumento da concentração do reagente formador da molécula. Desta forma, a concentração de Ca^{2+} foi mantida em 0,1 mg (10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1}) para os futuros experimentos envolvendo determinação de flúor a partir da molécula CaF .

4.1.5 Parâmetros de mérito e avaliação da exatidão

Uma primeira comparação das intensidades dos sinais analíticos obtidos utilizando 0,7 mg de amostra NIST 1632b (correspondente a 30 ng of F) e 6 μL de uma solução 5 mg L^{-1} de flúor (correspondente a 30 ng de F) foi realizada a partir das condições pré-estabelecidas (temperatura de pirólise, temperatura de vaporização e massa de Ca^{2+}), com o intuito de avaliar a similaridade dos sinais analíticos provenientes de amostra sólida e padrões em solução.

Nas condições estabelecidas, a molécula CaF apresentou o mesmo perfil analítico bem como intensidades de absorção similares ao se empregar flúor a partir de amostras sólidas e a partir de padrões em solução, permitindo, desta maneira, a utilização de curvas de calibração feitas a partir de padrões em soluções.

Portanto, a faixa de trabalho estudada foi linear utilizando massas entre 1 ng e 50 ng de flúor (como KF), pipetadas diretamente na plataforma de grafite recoberta com paládio como modificador permanente e adição de 10 μL de solução de Ca^{2+} 10 g L^{-1} como reagente formador da molécula, com temperaturas de pirólise e vaporização de 700 °C e 2100 °C, respectivamente.

O LOD e LOQ utilizando as equações descritas no item 3.10 foram 0,3 ng e 1,0 ng de flúor, respectivamente, enquanto que a m_0 foi 0,1 ng de flúor. Os parâmetros de mérito encontrados para a determinação de flúor a partir da molécula CaF estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Comprimento de onda e parâmetros de mérito determinados experimentalmente e utilizados para a determinação de flúor por HR-CS SS-GF MAS a partir de calibração utilizando padrões em soluções.

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda, nm ¹	606,432
Limite de detecção, ng ²	0,3
Limite de quantificação, ng ²	1,0
Massa característica, ng ³	0,10
Coefficiente de determinação, R	0,999
Faixa linear de trabalho, ng	1,0 a 50
Equação da curva de calibração ⁴	$y = 0,0457x + 0,0573$

¹ absorvância integrada utilizando três pixels (CP±1)

² calculado como 3 e $10\sigma/S$ ($n = 10$), respectivamente

³ calculado como $A_{\text{int}} = 0,0044$ s

⁴ absorvância integrada (s) e massa de F (ng), representada por y e x , respectivamente

Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

Para avaliar a exatidão do método proposto bem como sua aplicabilidade, foram utilizadas cinco amostras de CRM de carvão, das quais duas possuem concentrações de flúor certificados (NIST 1635 – $25,9 \pm 3,3 \mu\text{g g}^{-1}$ e BCR 40 – $111,4 \pm 8,5 \mu\text{g g}^{-1}$) e três não possuem valores informados. Neste caso, os valores encontrados utilizando o método proposto foram comparados com valores encontrados na literatura, quando disponíveis, e estão mostrados na Tabela 5.

Para as amostras NIST 1635 e BCR 40 as concentrações de flúor encontradas pelo foram $26,9 \pm 1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ e $115,4 \pm 23,6 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, não apresentando diferença significativa (teste *t-student* - nível de confiança de 95%) a partir dos valores certificados. Para o material certificado SARM 20, o qual não apresenta valores certificados, a concentração de flúor encontrada foi de $125,8 \pm 4,4 \mu\text{g g}^{-1}$ e não apresentou diferença significativa (teste *t-student*) quando comparado com os valores reportados por Dressler *et al.* (DRESSLER *et al.*, 2003), que utilizou um sistema de pirohidrólise como método de preparo de amostra e determinação de flúor por análise potenciométrica com eletrodo íon seletivo. Os materiais BCR 180 e SARM 18 apresentaram

concentrações de $84,8 \pm 5,7 \mu\text{g g}^{-1}$ e $103,8 \pm 4,3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, porém, não apresentam valores nem certificados nem reportados por outros autores.

Tabela 5. Determinação de flúor em diferentes amostras certificadas de carvão utilizando HR-CS SS-GF MAS. Os valores representam a média de cinco medidas \pm SD.

Amostra	Encontrado ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$)	Certificado ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$)	P
NIST 1635	$26,9 \pm 1,5$	$25,9 \pm 3,3$	0,55
BCR 40	$115,4 \pm 23,6$	$111,4 \pm 8,5$	0,73
BCR 180	$84,8 \pm 5,7$	n. i. ¹	-
SARM 20	$125,8 \pm 4,4$	$125,8 \pm 8,4^2$	0,99
SARM 18	$103,8 \pm 4,3$	n. i. ¹	-

¹n. i. = não informado

²encontrado por Dressler *et al.* (DRESSLER *et al.*, 2003)

Fonte: (MACHADO *et al.*, 2015).

4.1.6 Comparativo com a literatura

A técnica que faz uso da MAS para a determinação de flúor é uma das poucas que busca evitar etapas prévias de preparo de amostra e quantificar o analito em uma única etapa. No entanto, até o momento, um número limitado de trabalhos envolvendo MAS demonstram a determinação de flúor a partir de análise direta de amostras sólidas. Por exemplo, Ozbek e Akman demonstram a aplicabilidade da técnica HR-CS MAS para a determinação de flúor em amostras de leite (OZBEK *et al.*, 2013) e vinho (OZBEK *et al.*, 2015) utilizando a molécula CaF. Ozbek e Akman fizeram também a determinação de flúor em amostras de creme dental utilizando a molécula AlF (OZBEK *et al.*, 2012a) e em amostras de água a partir da molécula SrF (OZBEK *et al.*, 2012b). Da mesma forma, Morés *et al.* (MORÉS *et al.*, 2011) também demonstrou a aplicabilidade da molécula CaF para a determinação de flúor em amostras de chá utilizando a técnica HR-CS GF MAS. No entanto

as amostras foram previamente solubilizadas e injetadas na forma líquida.

Na Tabela 6 está a relação das principais metodologias que fazem uso de MAS para a determinação de flúor em diferentes matrizes, bem como os LOD e m_0 encontrados por cada metodologia empregada. São mostradas também as diferentes moléculas diatómicas formadas entre flúor e demais cátions vaporizados a partir de GF ou espectrometria de absorção molecular utilizando chama (F MAS). Em comparativo com os demais métodos que empregam MAS e a molécula CaF é possível identificar o baixo LOD (0,3 ng de F) encontrado neste estudo.

Tabela 6. Limites de detecção, tipo de amostra e moléculas utilizadas para a determinação de flúor por GF MAS e F MAS em comparação com a metodologia desenvolvida neste estudo.

Referência	Amostra	Molécula	m_0 (ng)	LOD (ng)
(FLORES <i>et al.</i> , 2007)	Carvão	AlF	GF MAS	0,10
(OZBEK e AKMAN, 2012a)	Creme dental	AlF	F MAS	5,5 ^b
(MORÉS <i>et al.</i> , 2011)	Chá	CaF	GF MAS	1,6
(OZBEK e AKMAN, 2013)	Leite	CaF	GF MAS	0,26
(BORGES <i>et al.</i> , 2014)	Chá	CaF	GF MAS	0,04
(OZBEK <i>et al.</i> , 2016)	Alimento	CaF	GF MAS	0,20
(OZBEK e AKMAN, 2015)	Vinho	CaF	GF MAS	0,18
(GLEISNER <i>et al.</i> , 2011)	Creme dental	GaF	GF MAS	0,05
(KRÜGER <i>et al.</i> , 2012)	Fármaco	GaF	GF MAS	0,23
(OZBEK e AKMAN, 2012b)	Água	SrF	GF MAS	0,36
Este trabalho	Carvão	CaF	GF MAS	0,30

^a limite de detecção expressada em mg L^{-1}

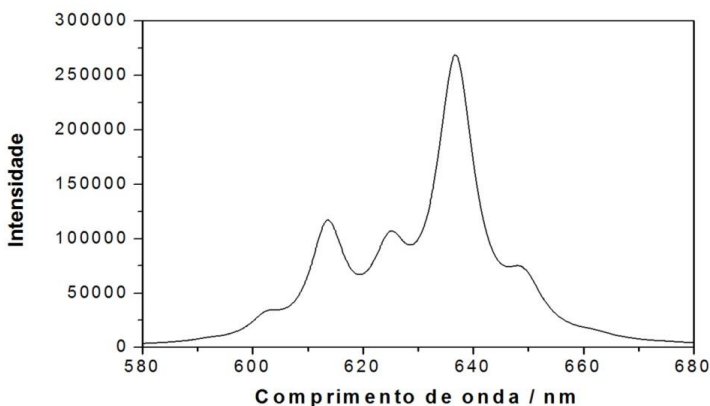
Fonte: Autoria própria.

4.2 Determinação de cloro em amostras biológicas

4.2.1 Estudo da região espectral de trabalho

Para a determinação de cloro uma nova proposta utilizando a molécula SrCl é apresentada. Para isso um espectro de absorção da molécula SrCl foi otimizado utilizando teoria do funcional da densidade dependente do tempo, TD-DFT, e nível de teoria BHandHLYp/def2-QZVP. Utilizando tais ferramentas a distância inter-nuclear ($2,592 \text{ \AA}$) e a frequência de vibração harmônica ($299,7 \text{ cm}^{-1}$) calculados foram concordantes com os resultados experimentais ($2,576 \text{ \AA}$ (SCHÜTZE-PAHLMANN *et al.*, 1982) e 300 cm^{-1} (MORE *et al.*, 1938)), respectivamente. O espectro de absorção simulado (Figura 10) demonstrou uma banda de alta intensidade em $636,8 \text{ nm}$ com bandas de menor intensidade entre 600 e 660 nm .

Figura 10. Espectro de absorção simulado para a molécula SrCl utilizando cálculos teóricos TD-DFT.

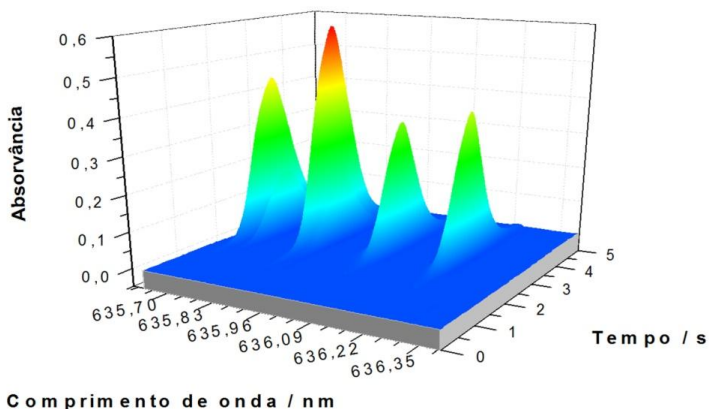


Fonte: (PEREIRA, WELZ, *et al.*, 2014).

A próxima etapa foi avaliar experimentalmente a região espectral demonstrada nos cálculos teóricos. Para isso, uma faixa espectral entre

635 nm e 637 nm foi avaliada (com incrementos de 0,4 nm), utilizando uma solução contendo 20 ng de cloreto (como NaCl) e uma solução contendo 100 µg de Sr^{2+} como reagente formador. Nestas condições, foi observada uma forte banda de absorção em 635,862 nm (Figura 11), a qual diferenciou apenas 0,95 nm do resultado calculado teoricamente. Em adição, o espectro de absorção da molécula SrCl apresentou uma sequência de bandas de menor intensidade, o que é característico de espectros rotacionais de moléculas diatômicas. Outro ponto positivo é a faixa espectral de absorção da molécula, a qual possui baixo risco de interferências devido ao baixo número de moléculas e/ou átomos capazes de absorverem nesta região (entre 630 nm e 640 nm).

Figura 11. Espectro de absorção resolvido temporalmente para a molécula SrCl na faixa entre 635,6 nm e 636,4 nm. Condições: 20 ng de cloro (20 µL de uma solução de 1 mg L⁻¹) e adição de 0,1 mg de Sr^{2+} (10 µL de uma solução de Sr^{2+} contendo 10 g L⁻¹).



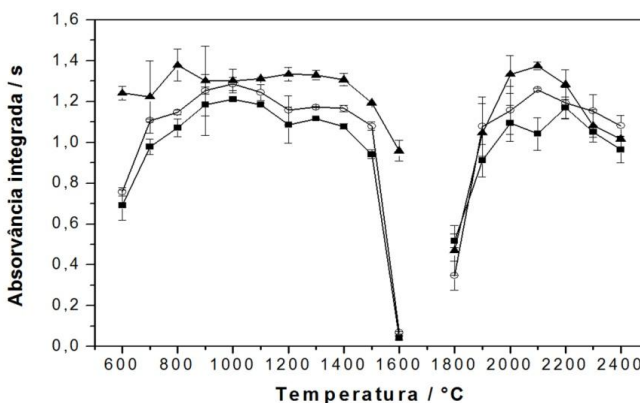
Fonte: (PEREIRA, WELZ, *et al.*, 2014).

A partir dos dados obtidos nesta avaliação que envolve a proposta de uma nova molécula diatômica, denominada aqui monocloreto de estrôncio (SrCl), foi possível estudar os efeitos das temperaturas de pirólise e vaporização, além do efeito de modificadores químicos permanentes no seu emprego em SS para a determinação de cloro em amostras biológicas.

4.2.2 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões aquosos

A próxima etapa foi o estudo da influência dos modificadores químicos permanentes paládio e zircônio nas temperaturas de pirólise e vaporização da molécula SrCl utilizando padrão em solução. Quando modificadores permanentes foram utilizados, a sensibilidade foi aumentada comparada à sensibilidade encontrada para plataforma de grafite sem recobrimento (Figura 12).

Figura 12. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula SrCl formada à partir de 50 ng de cloro ($10 \mu\text{L}$ de uma solução de 5 mg L^{-1}) e adição de $0,10 \text{ mg}$ de Sr^{2+} ($10 \mu\text{L}$ de uma solução de 10 g L^{-1} de Sr^{2+}). Para a otimização da temperatura de pirólise, a temperatura de vaporização foi fixada em $2100 \text{ }^\circ\text{C}$ e para a otimização da temperatura de vaporização, a temperatura de pirólise utilizada foi de $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ para paládio (\circ) e plataforma sem recobrimento (\blacksquare), e de $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ para zircônio (\blacktriangle). Média e SD obtidos utilizando $n = 3$.



Fonte: (PEREIRA, WELZ, *et al.*, 2014).

Entretanto, enquanto a máxima temperatura de pirólise para o modificador zircônio pode ser encontrada em torno de $1400 \text{ }^\circ\text{C}$, a máxima temperatura de pirólise encontrada para o modificador paládio e

para a plataforma sem recobrimento não excederam 1000 °C. Além das medidas utilizando padrões em solução, o branco também foi monitorado a fim de eliminar a possibilidade do aumento de sensibilidade dos modificadores permanentes ter sido por conta de contaminação, sendo que nenhum sinal analítico maior que a absorvância integrada do branco contendo apenas Sr^{2+} foi observado.

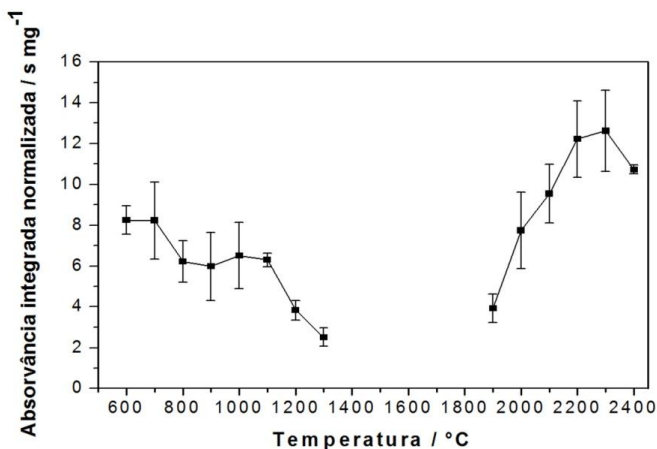
Em relação às temperaturas de vaporização, plataforma contendo zircônio e paládio como modificadores permanentes e plataforma sem recobrimento apresentaram, em termos de sensibilidade, o mesmo comportamento encontrado na avaliação das curvas de pirólise empregando padrão em solução. Ao se utilizar zircônio como modificador permanente, temperaturas de vaporização de até 2100 °C foram encontradas com sensibilidade 17% maior quando comparada às curvas utilizando paládio como modificador permanente e 30% utilizando plataforma sem recobrimento. Este ganho de sensibilidade atrelada às altas temperaturas de pirólise possibilitou a escolha de plataforma recoberta com zircônio para os estudos futuros.

Zircônio (grupo 4) apresenta como característica principal a formação de carbetos (ZrC) quando aquecido em GF, inibindo assim a interação dos constituintes formadores da molécula com o carbono da plataforma de grafite. Esta característica é fundamental, pois um elemento formador de carbeto pode atuar ativamente quando amostras sólidas ricas em carbono forem empregadas (VOLYNSKY, 2000).

4.2.3 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para amostras sólidas

O próximo passo foi avaliar a possibilidade do uso da nova molécula SrCl, formada até então apenas em solução, frente a constituintes presentes em uma amostra sólida sem qualquer etapa de pré-tratamento da mesma. Desta forma, levando em consideração os resultados obtidos para a molécula SrCl em solução utilizando zircônio como modificador permanente (item 4.2.2), foi feita uma nova otimização utilizando amostras biológicas e as condições pré-fixadas. Os resultados para as curvas de pirólise e vaporização utilizando o material de referência RM 8414 (músculo bovino), estão mostrados na Figura 13.

Figura 13. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula SrCl formada utilizando aproximadamente 0,05 mg de amostra de referência RM 8414 (90 ng de cloro), adição de 0,10 mg de Sr²⁺ (10 µL de uma solução de 10 g L⁻¹ de Sr²⁺) e zircônio como modificador permanente. Para a otimização da temperatura de pirólise, a temperatura de vaporização foi fixada em 2100 °C enquanto que, para a otimização da temperatura de vaporização, a temperatura de pirólise utilizada foi de 600 °C. Média e SD obtidos utilizando n = 3.

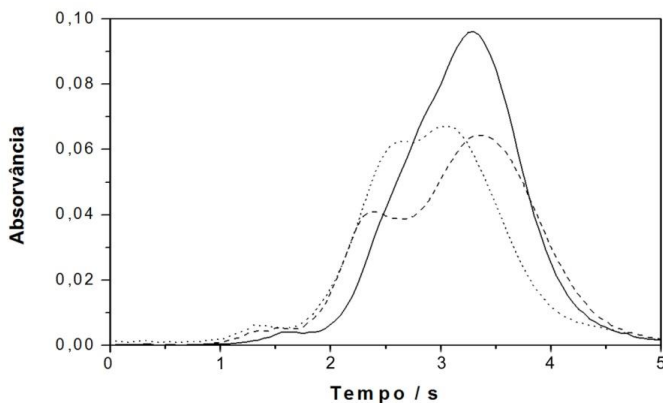


Fonte: (PEREIRA, WELZ, *et al.*, 2014).

A máxima temperatura de pirólise alcançada para a análise direta de amostras sólidas sem perda de sensibilidade e com boa repetitividade (desvio menor que 5%) foi de 600 °C utilizando zircônio como modificador químico permanente. A partir desta temperatura os sinais analíticos passaram a ser deformados e com picos duplos (Figura 14), o que explica os altos desvios encontrados nas temperaturas entre 700 °C e 1000 °C. Provavelmente, devido à origem do analito (moléculas orgânicas), diferentes mecanismos reacionais podem ser ativados quando amostras biológicas são utilizadas. Esses mecanismos possivelmente são diferentes daqueles observados quando íons em solução são utilizados, como no caso do estudo envolvendo solução padrão de NaCl, por exemplo. No caso de temperaturas de vaporização,

a máxima temperatura encontrada foi entre 2200 °C e 2300 °C utilizando temperatura de pirólise de 600 °C previamente fixada a partir dos estudos envolvendo curvas de pirólise.

Figura 14. Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula SrCl formada a partir de $\approx 0,05$ mg de amostra RM 8414 (≈ 90 ng de cloro), adição de 0,10 mg de Sr^{2+} (10 μL de uma solução de 10 g L^{-1} de Sr^{2+}) e zircônio como modificador permanente. As linhas representam o sinal analítico obtido em temperaturas de pirólise de 600 °C (linha sólida), 700 °C (linha tracejada) e 800 °C (linha pontilhada). Para todos os experimentos foi utilizada a temperaturas de vaporização de 2100 °C.



Fonte: (PEREIRA, WELZ, *et al.*, 2014).

4.2.4 Otimização da massa do reagente formador da molécula

A massa de Sr^{2+} foi otimizada para prevenir a perda de sensibilidade da molécula SrCl formada em GF devido à competições por conta de reações de outros constituintes da matriz com o reagente formador da molécula. O excesso de Sr^{2+} no tubo de grafite possibilita que íons cloreto e cloro ligado a moléculas orgânicas sejam vaporizados com boa eficiência. Neste sentido, a massa de reagente formador da molécula foi estudada com concentrações entre 50 μg e 200 μg de Sr^{2+} pipetados diretamente na plataforma de grafite recoberta com zircônio como modificador químico permanente. O comportamento do sinal analítico alcança um platô

quando concentrações acima de 100 μg de Sr^{2+} são utilizadas, provendo também alta repetitividade dos resultados e sinais analíticos não deformados.

4.2.5 Parâmetros de mérito e avaliação da exatidão

Previamente aos estudos envolvendo curvas de calibração, foi feita a comparação dos sinais analíticos obtidos para soluções contendo 90 ng de cloro com os sinais analíticos obtidos a partir da vaporização de 0,05 mg de material de referência RM 8414 (correspondente a 90 ng de cloro). As intensidades dos sinais analíticos provenientes de padrões em solução e de amostra sólida utilizando 600 °C e 2300 °C como temperaturas de pirólise e vaporização, respectivamente, foram muito similares, possibilitando desta maneira o uso da curva de calibração a partir de padrões aquosos.

Sendo assim, a faixa de trabalho para quantificação de cloro foi linear entre 3 ng e 100 ng de cloro, pipetadas diretamente na plataforma de grafite recoberta com zircônio como modificador permanente e adição de 10 μL de solução de Sr^{2+} 10 g L^{-1} como reagente formador da molécula. Nesta condição, o coeficiente angular da curva de calibração foi de 0,0020 $\text{ng}^{-1} \text{s}^{-1}$ e o coeficiente de determinação melhor que 0,997. O LOD e LOQ do método proposto foram determinados experimentalmente como sendo 1,0 ng e 3,3 ng de cloro respectivamente, enquanto que a m_0 foi de 2,2 ng de cloro. Os parâmetros de mérito encontrados para a determinação de cloro a partir da molécula SrCl podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7. Figuras de mérito encontrados para a determinação de cloro por SS-HR-CS GF MAS a partir de calibração utilizando soluções aquosas.

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda, nm ¹	635,862
Limite de detecção, ng ²	1,0
Limite de quantificação, ng ²	3,3
Massa característica, ng ³	2,2
Coefficiente de correlação, R	0,997
Faixa linear de trabalho, ng	3 a 100

¹ absorvância integrada utilizando três pixels (CP±1)

² calculado como $3 + 10\sigma/S$ (n = 10)

³ calculado como $A_{int} = 0,0044$ s

Fonte: Autoria própria.

A exatidão do método otimizado foi avaliada utilizando diferentes amostras biológicas certificadas e ainda comparando os valores encontrados com os valores obtidos utilizando a técnica SS-ETV-ICP-MS. Os valores encontrados para as duas técnicas podem ser comparados na Tabela 9. Os valores das concentrações de cloro encontrados nos CRMs NIST 8414, NIST 1577b, NCS ZC e NBS 1567a utilizando o método proposto a partir de calibração com soluções padrão não apresentaram diferença estatística segundo teste de *Tukey-Kramer* (com um nível de confiança de 95%) quando comparados com os valores encontrados por SS-ETV-ICP-MS e com os valores certificados. Para as amostras BCR 186 e BCR 278R não são disponíveis valores certificados da concentração de cloro nestes materiais, porém a exatidão do método proposto pôde ser avaliada comparando os resultados encontrados por MAS com aqueles encontrados por SS-ETV-ICP-MS. Para os dois materiais as concentrações de cloro não apresentaram diferença significativa (teste *t-student* com um nível de confiança de 95%) comparando as duas técnicas de determinação.

Tabela 8. Determinação de cloro em materiais biológicos de referência certificados por HR-CS SS-GF MAS em comparação com SS-ETV-ICP-MS. Os valores representam a média \pm SD.

Amostra	Concentração (% \pm SD)		Certificado (%)	p
	GF MAS	ETV-ICP-MS		
NIST 8414	0,175 \pm 0,002	0,192 \pm 0,018	0,188 \pm 0,015	0,16
NIST 1577b	0,280 \pm 0,050	0,285 \pm 0,021	0,278 \pm 0,006	0,97
NCS 71001	0,28 \pm 0,03	0,28 \pm 0,05	0,29 \pm 0,04	0,90
NBS 1567a	0,059 \pm 0,005	0,051 \pm 0,009	0,056 ^a	0,12
BCR 186	0,86 \pm 0,08	0,72 \pm 0,09	n.i ^b	0,11
BCR 278R	1,99 \pm 0,40	2,22 \pm 0,12	n.i ^b	0,39

^a valor indicado; ^b não informado;

Fonte: (PEREIRA, WELZ, *et al.*, 2014).

4.2.6 Considerações sobre a molécula SrCl

O uso de Sr²⁺ na determinação de cloro não é novidade na literatura. Heitmann *et al.* (HEITMANN *et al.*, 2006) descrevem o emprego de Sr²⁺ na determinação de cloro em material de referência certificado (farinha de centeio), mas utilizando Sr²⁺ como modificador químico e não como reagente formador da molécula. Neste caso, os autores empregaram alumínio como reagente formador da molécula diatômica AlCl formada em temperaturas de vaporização de 2200 °C e detectada em 261,42 nm. Um dos resultados relevante no trabalho de Heitmann *et al.* (HEITMANN *et al.*, 2006) é que nenhum sinal analítico foi observado na ausência de Sr²⁺, enquanto que um prévio recobrimento da plataforma de grafite com zircônio resultou em um baixo sinal analítico. Isso demonstra que Sr²⁺ funcionou como modificador químico enquanto zircônio inibiu a interação entre reagentes e carbono da plataforma de grafite. Outra constatação de Heitmann *et al.* (HEITMANN *et al.*, 2006) é a dificuldade analítica encontrada ao se trabalhar na região espectral entre 261,3 nm e 261,5 nm, região esta de possíveis sobreposições de comprimentos de onda devido ao número de átomos que podem absorver radiação nesta região.

Desta forma, encontrar uma molécula diatômica formada a partir de um modificador químico e que absorva radiação em uma faixa espectral menos complexa e, apesar de menor energia de dissociação comparada à energia de dissociação da molécula AlCl , apresente boa sensibilidade, parece ser de grande relevância. A molécula SrCl possui energia de dissociação de 409 kJ mol^{-1} , sendo menor que a energia de dissociação da molécula AlCl (511 kJ mol^{-1}). Porém, apresentou LOD de $1,0 \text{ ng}$ de cloro (item 4.2.5), valor considerado ideal para a determinação de cloro em amostras biológicas. Ainda, o uso de Sr^{2+} como reagente formador contribui para a geração e estabilização da molécula diatômica em fase gasosa, permitindo boa repetitividade e baixos RSD. A faixa de absorção da molécula SrCl ($635,862 \text{ nm}$) também é um fator positivo determinante para o sucesso desta nova abordagem, pois nesta região poucas linhas atômicas são detectadas, reduzindo assim a possibilidade de sobreposição de linhas de absorção atômica e/ou moleculares com a da molécula SrCl .

Outro fator que chama a atenção nesta discussão é a competição do cátion Al^{3+} com o cátion Sr^{2+} na presença de cloro, o qual poderia interferir reduzindo o número de moléculas formadas em fase gasosa e consequentemente na redução do sinal analítico. No entanto, esta competição foi desconsiderada neste trabalho, pois Sr^{2+} está em excesso no tubo de grafite, garantindo assim que a formação da molécula AlCl não seja preferencialmente formada nas condições estabelecidas. Este fato pode ser sustentado a partir dos resultados encontrados com os experimentos utilizando materiais de referência RM 8414, CRM NBS 1567a e NCS 71001, cujos valores certificados de alumínio são $1,7 \mu\text{g g}^{-1}$, $5,7 \mu\text{g g}^{-1}$ e $12 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Mesmo contendo alumínio em concentrações relativamente elevadas, cloro foi determinado com relativa exatidão e precisão. Na Tabela 9 é demonstrado um resumo dos trabalhos que descrevem o emprego da técnica de MAS para a determinação de cloro em diferentes amostras bem como os LOD encontrados em comparação com o LOD encontrado neste trabalho.

Tabela 9. Limites de detecção, tipo de amostra e moléculas utilizadas para a determinação de cloro utilizando GF MAS e F MAS em comparação com a metodologia desenvolvida neste estudo.

Referência	Amostra	Molécula	Técnica	LOD (ng)
(FECHETIA <i>et al.</i> , 2012)	Comida	AlCl	GF MAS	1,2
(HEITMANN <i>et al.</i> , 2006)	Biológicas	AlCl	GF MAS	0,070
(ENDERS <i>et al.</i> , 2016)	Óleo cru	AlCl		1,4 ^b
		SrCl	GF MAS	0,5 ^b
		InCl		1,4 ^b
(MACHYŇÁK <i>et al.</i> , 2016)	Água	InCl	GF MAS	0,10
(HUANG <i>et al.</i> , 2006a)	Sedimento	InCl	F MAS	3,0 ^a
(GUARDA <i>et al.</i> , 2017)	Carvão	CaCl	GF MAS	0,75
Este trabalho	Carvão	SrCl	GF MAS	1,0

^a concentração em mg L⁻¹; concentração em mg kg⁻¹; ^{n.i.} não informado

Fonte: Autoria própria.

Este trabalho que faz o emprego da molécula SrCl para a determinação de cloro em amostras biológicas foi precursor para o desenvolvimento de novas metodologias, dentre as quais, a metodologia que faz a determinação de cloro em amostras de carvão utilizando SS (Apêndice 1). Neste trabalho, zircônio também foi utilizado como modificador permanente a fim de aumentar a sensibilidade da molécula SrCl formada em forno de grafite e os parâmetros de mérito como LOD e m_0 foram avaliadas sendo encontradas como 0,85 ng e 0,24 ng, respectivamente. Ainda, a exatidão da metodologia proposta foi avaliada utilizando quatro amostras de CRM e tiveram seus valores comparados com aqueles obtidos utilizando ETV-ICP-MS, não demonstrando diferença significativa entre as três avaliações (teste *t-student* com um nível de confiança de 95%).

Ainda, utilizando a metodologia proposta, cloro também tem sido avaliado em amostras de óleo de peixe utilizando a molécula SrCl formada em forno de grafite (Apêndice 2). Além de ser o pioneiro na

determinação de cloro em amostras de óleo de peixe utilizando a molécula SrCl este trabalho também foi singular na determinação de cloro utilizando injeção direta da amostra diluída com 1-propanol. A exatidão neste caso foi assegurada utilizando titulação coulométrica após combustão da amostra lipídica e não demonstraram diferenças significativas entre os resultados obtidos (teste *t-student*, nível de confiança de 95%).

4.3 Determinação de bromo em amostras de carvão

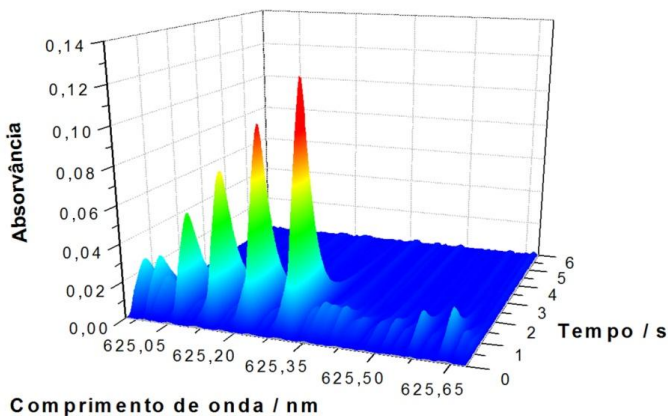
4.3.1 Estudo da região espectral de trabalho

Bromo, apesar de possuir energia de ionização de 11,8 eV, a qual é menor que os halogênios cloro e flúor que possuem energias de ionização de 12,9 eV e 17,4 eV, respectivamente, ainda apresenta grandes dificuldades em relação à sua quantificação utilizando técnicas baseadas em plasma como ICP-MS e ICP OES. A técnica de ICP OES encontra limitação para separar as linhas de emissão deste elemento que se encontram no UVU e o mesmo acontece com a técnica de AAS. Desta forma, a MAS que faz uso de sinais analíticos obtidos a partir de moléculas diatômicas formadas em fase gasosa, tem sido uma boa alternativa para a determinação de bromo em amostras complexas.

A determinação de bromo por HR-CS GF MAS foi feita utilizando a molécula CaBr, a qual tem sido utilizada na literatura, mas poucos trabalhos demonstram sua aplicabilidade em SS. A molécula CaBr apresenta fortes bandas de absorção na região do espectro eletromagnético por volta de 625 nm, possuindo máxima absorção em 625,315 nm referente à transição eletrônica $X^2\Sigma^+ - A^2\Pi$ (PLASUS, 1998), que é mostrada na Figura 15.

Esta molécula tem sido muito bem empregada por Huang *et al.* (HUANG *et al.*, 2008), Limburg e Einax (LIMBURG e EINAX, 2013) e Flórez e Resano (FLÓREZ e RESANO, 2013) na determinação de bromo em amostras de sal e produtos farmacêuticos, água e materiais retardantes de chama e plástico, respectivamente.

Figura 15. Espectro de absorvância resolvido temporalmente para a molécula CaBr com um máximo de absorção em 625,315 nm utilizando 120 ng de bromo ($6 \mu\text{L}$ de uma solução de 20 mg L^{-1}), adição de $20 \mu\text{L}$ de solução de Ca^{2+} contendo 20 g L^{-1} e zircônio como modificador químico permanente.



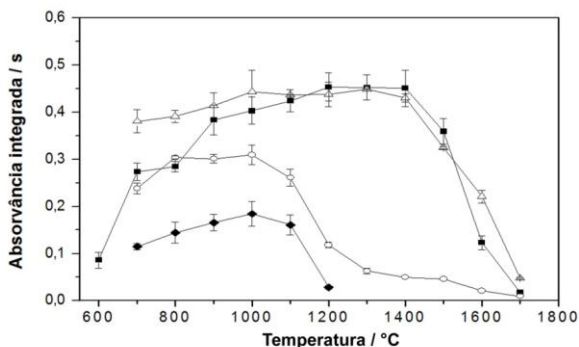
Fonte: (PEREIRA, CASTILHO, *et al.*, 2014)

4.3.2 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões aquosos

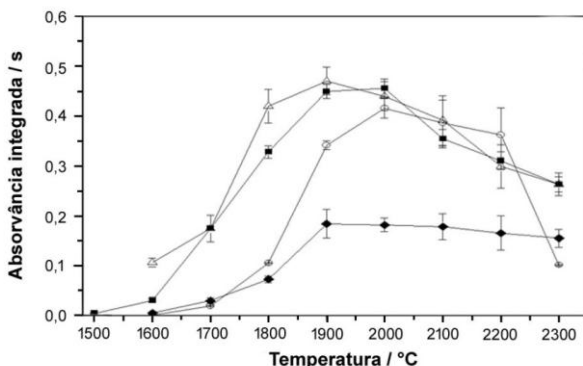
Como foi descrito anteriormente, Ca^{2+} possui forte afinidade com o carbono proveniente da plataforma de grafite, tornando as determinações por MAS sujeitas a interferências quando esse cátion é empregado como reagente formador da molécula diatômica. Nesse sentido, buscou-se inibir a interação entre reagentes e plataforma de grafite utilizando diferentes modificadores químicos permanentes, tais como zircônio, rutênio e paládio, além da adição da mistura paládio/magnésio juntamente com a amostra. A influência de cada modificador químico permanente nas curvas de pirólise e vaporização pode ser visto nas Figuras 16A e 16B.

Figura 16. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula CaBr formada à partir de 120 ng de bromo (6 μL de uma solução de 20 mg L^{-1}) e adição de 20 μL de uma solução 20 g L^{-1} (0,20 mg de Ca^{2+}). Para a otimização da temperatura de pirólise (A), a temperatura de vaporização foi fixada em 1900 $^{\circ}\text{C}$ enquanto que, para a otimização da temperatura de vaporização (B), a temperatura de pirólise utilizada foi 1350 $^{\circ}\text{C}$ para zircônio (■), 1000 $^{\circ}\text{C}$ para rutênio (○), 1500 $^{\circ}\text{C}$ para paládio (Δ), e 1000 $^{\circ}\text{C}$ para plataforma sem recobrimento (◆), respectivamente. Média e SD obtidos utilizando $n = 3$.

A



B



Fonte: (PEREIRA, CASTILHO, *et al.*, 2014).

Dentre os modificadores avaliados, zircônio e paládio foram os mais eficientes em relação à máxima temperatura de pirólise, onde temperaturas de até 1400 $^{\circ}\text{C}$ podem ser usadas sem perda de sensibilidade. Rutênio demonstrou maior sensibilidade quando

comparado com os resultados obtidos utilizando plataforma sem recobrimento, no entanto a máxima temperatura de pirólise não excedeu 1000 °C. Resultado semelhante foi encontrado para plataforma sem recobrimento, porém, como mencionado anteriormente, com menor sensibilidade que os experimentos utilizando modificador químico permanente.

Em relação à influência dos modificadores permanentes nas curvas de vaporização, os comportamentos foram semelhantes aos encontrados para as curvas de pirólise utilizando zircônio e paládio para o recobrimento. Rutênio, no entanto, representou maior sensibilidade quando comparado com as mesmas condições de pirólise, mas em temperaturas de vaporização de 2000 °C. Este resultado indica que nas otimizações da curva de pirólise, a temperatura de 1900 °C, estava fora da condição ótima. A plataforma sem recobrimento não apresentou ganho significativo de sensibilidade mesmo em uma ampla faixa de temperatura.

Outra estratégia adotada neste trabalho foi a adição da mistura de paládio/magnésio sobre a solução nos experimentos de pirólise e vaporização que tiveram maior sinal analítico integrado avaliados anteriormente. No entanto, nenhum ganho real de sensibilidade foi encontrado para as condições avaliadas. Este ganho de sensibilidade a partir da adição de paládio/magnésio foi observado por Limburg e Einax (LIMBURG e EINAX, 2013) na determinação de bromo utilizando a molécula CaBr formada em tubo de grafite sem plataforma mas recoberta com zircônio como modificador químico permanente. Provavelmente, os mecanismos envolvendo aquecimento direto do tubo de grafite desencadeiam caminhos diferentes de formação da molécula quando comparados com aqueles envolvidos a partir de uma plataforma.

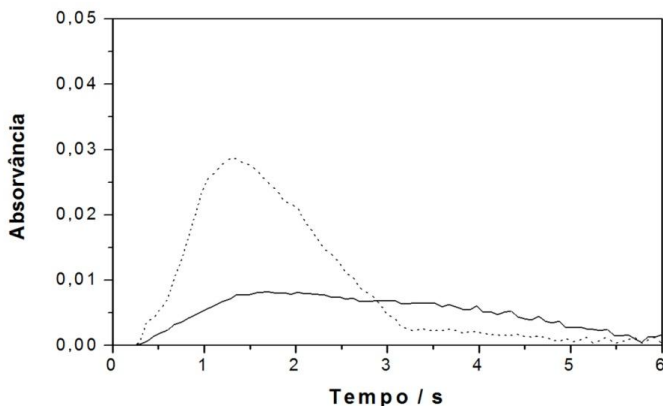
4.3.3 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para SS

Testes preliminares utilizando amostras de carvão e o procedimento de SS demonstraram sinais analíticos distorcidos, os quais foram totalmente diferentes dos sinais analíticos encontrados para padrões em solução. A possível explicação para este resultado é a forte interação do reagente formador Ca^{2+} com o carbono presente na amostra de carvão, o qual inibe a vaporização da molécula CaBr em forno de

grafite mesmo quando altas concentrações de Ca^{2+} foram empregadas. Neste sentido, este trabalho avaliou um novo caminho que mantém o reagente formador da molécula separado da amostra sólida.

Para isso, a solução do reagente Ca^{2+} foi pipetada diretamente no tubo de grafite sem plataforma e então sobre esta solução inserida a plataforma de grafite SS contendo a amostra. Todo o conjunto foi submetido ao programa de aquecimento ajustado descrito na Tabela 2. Desta forma, a amostra foi submetida às etapas de secagem e pirólise sem contato com o reagente formador, permitindo que os sinais analíticos adquiridos com a nova abordagem (Figura 17) fossem adequados para o propósito analítico.

Figura 17. Sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaBr utilizando 1,5 mg de amostra (BCR 182), zircônio como modificador permanente e SS; linha sólida: 20 μL de solução de Ca^{2+} de 20 g L^{-1} adicionados sobre a amostra; linha pontilhada: 50 μL de solução de Ca^{2+} contendo 20 g L^{-1} introduzidos diretamente no tubo de grafite e colocando a plataforma de grafite SS contendo amostra depositada sobre a solução.

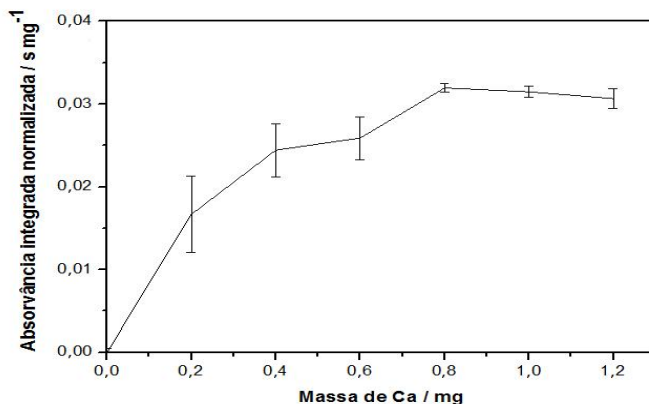


Fonte: (PEREIRA, CASTILHO, *et al.*, 2014).

Buscou-se avaliar previamente às curvas de pirólise e vaporização a massa de Ca^{2+} necessária para nova condição. Para isto, a massa de CRM BCR 180 foi mantida constante enquanto que volumes entre 10 e 60 μL de uma solução de Ca^{2+} de concentração de 20 g L^{-1} (referente à 0,2 mg e 1,2 mg de Ca^{2+}) foram adicionados no tubo de grafite utilizando o procedimento descrito anteriormente. Na Figura 18

está mostrado o sinal analítico obtido para as diferentes massas de Ca^{2+} empregadas. É possível observar que a sensibilidade aumenta significativamente entre 0,2 mg e 0,8 mg de Ca^{2+} (10 μL e 40 μL de solução), permanecendo constante com maiores massa de Ca^{2+} . Desta forma, a massa de 1,0 mg de Ca^{2+} (50 μL de solução de Ca^{2+} 20 g L^{-1}) foi mantida para os próximos estudos envolvendo curvas de pirólise e vaporização utilizando a nova abordagem e SS.

Figura 18. Correlação entre a massa de Ca^{2+} pipetada no tubo de grafite e absorvância normalizada para 3 mg de CRM BCR 180 (referente à 100 ng de bromo). Condições: Temperaturas de pirólise e vaporização de 1100 °C e 2200 °C, respectivamente. Média \pm SD (n = 3).



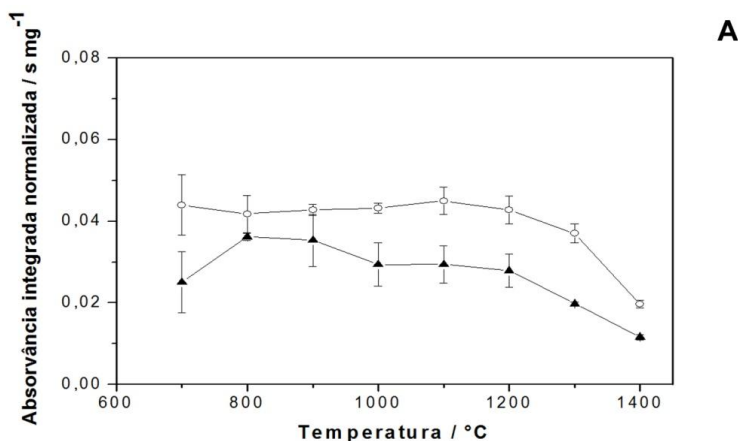
Fonte: (PEREIRA, CASTILHO, *et al.*, 2014).

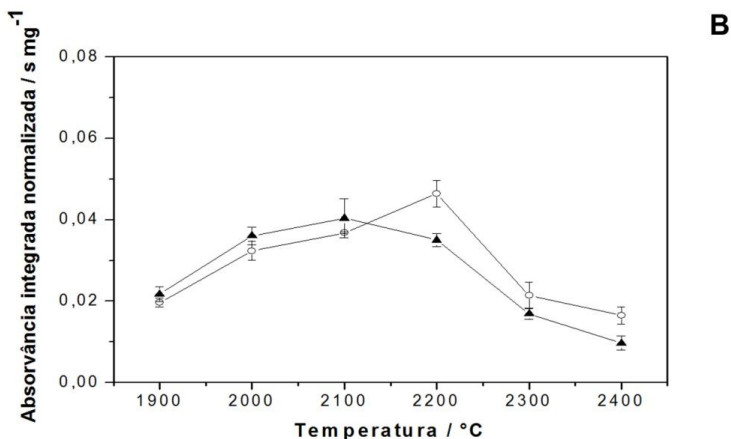
As curvas de pirólise e vaporização para a nova abordagem foram otimizadas utilizando zircônio e paládio como modificadores químicos permanentes. Estes dois modificadores apresentaram boa sensibilidade no estudo de temperaturas de pirólise e vaporização envolvendo o emprego de padrões em solução. Os resultados para as curvas de pirólise e vaporização utilizando análise direta de amostras sólidas podem ser vistos na Figura 19A e 19B, respectivamente.

Temperaturas de pirólise de 1100 °C foram obtidas para os dois modificadores permanentes sem perda de sensibilidade do analito. No entanto, na avaliação das curvas de vaporização, zircônio resultou em

condição de maior sensibilidade quando comparado com plataforma recoberta com paládio como modificador químico. Enquanto zircônio tem a propriedade de formar compostos refratários com carbono, paládio forma compostos de intercalação com a superfície de grafite (ORTNER et al., 2002). No entanto, zircônio parece inibir a interação C-analito (plataforma ou amostra) mais eficientemente que paládio. Desta forma, zircônio foi selecionado como modificador químico permanente para os estudos posteriores.

Figura 19. Curvas de pirólise e vaporização para a molécula CaBr formada à partir de 3 mg de CRM BCR 182 com plataforma de grafite SS contendo zircônio (○) e paládio (▲) como modificadores químicos permanentes. Para a otimização das temperaturas de pirólise (A), a temperatura de vaporização foi fixada em 2100 °C enquanto que, para a otimização da temperatura de vaporização (B), a temperatura de pirólise utilizada foi de 1100 °C para os dois modificadores. Massa de Ca^{2+} : 1,0 mg (50 μL de uma solução 20 g L^{-1}). Média \pm SD (n = 3).





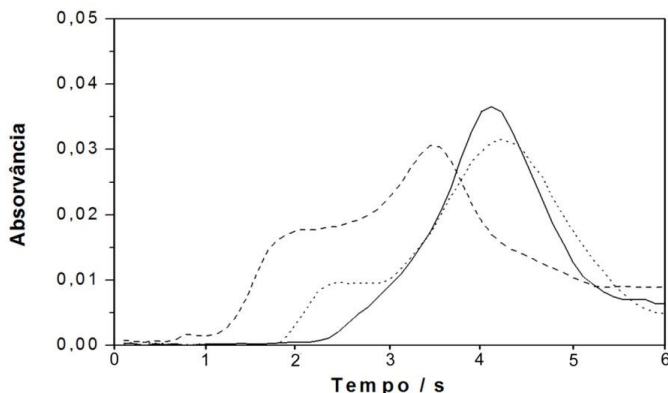
Fonte: (PEREIRA, CASTILHO, *et al.*, 2014).

4.3.4 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para padrões em solução utilizando analito separado do reagente formador

A possibilidade do uso de padrões em solução para a construção das curvas de calibração na determinação de bromo utilizando HR-CS SS-GF MAS também foi avaliada. Para isto, buscou-se avaliar o comportamento da molécula CaBr formada a partir do íon proveniente de padrões em solução bem como a estabilidade da molécula formada utilizando Ca^{2+} separado do analito. Neste sentido, as curvas de pirólise e vaporização foram avaliadas para padrões em solução utilizando a nova abordagem (solução formadora separada do analito).

As temperaturas ótimas de pirólise e vaporização foram 800 °C e 2200 °C, respectivamente, para as condições abordadas. Cabe ressaltar ainda que, em temperaturas de pirólise acima de 800 °C, os sinais apresentaram distorções bem como duplos picos, os quais podem ser vistos na Figura 20. Uma discussão detalhada a respeito desse comportamento anormal dos reagentes e/ou molécula no tubo de grafite é apresentada mais adiante na seção 4.3.6.

Figura 20. Comparação dos sinais analíticos resolvidos temporalmente para a molécula CaBr para a vaporização de 30 ng de bromo e adição de 50 μL de uma solução de Ca^{2+} contendo 20 g L^{-1} . Linha sólida: temperatura de pirólise de 800 $^{\circ}\text{C}$, $A_{\text{int}} = 0,058$ s; linha pontilhada: temperatura de pirólise de 900 $^{\circ}\text{C}$, $A_{\text{int}} = 0,122$ s; linha tracejada: temperatura de pirólise de 1000 $^{\circ}\text{C}$, $A_{\text{int}} 0,143$ s. Temperatura de vaporização de 2200 $^{\circ}\text{C}$.



Fonte: (PEREIRA, CASTILHO, *et al.*, 2014).

4.3.5 Parâmetros de mérito e resultados analíticos

Levando em consideração os resultados encontrados a partir dos experimentos utilizando material sólido e padrões em solução (4.3.3 e 4.3.4, respectivamente), onde temperaturas de pirólise e de vaporização de 800 $^{\circ}\text{C}$ e 2200 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente, satisfazem as duas condições avaliadas (amostra sólida e solução), foi possível utilizar as curvas de calibração a partir de padrões em solução para determinação de bromo com SS.

A faixa linear de trabalho foi encontrada experimentalmente entre 15 ng e 150 ng de bromo, pipetados em plataforma de grafite recoberta com zircônio como modificador químico permanente e 50 μL de uma solução de Ca^{2+} contendo 20 g L^{-1} pipetada diretamente no tubo de grafite. O coeficiente angular encontrado foi de $S = 0,0013 \text{ s ng}^{-1}$ enquanto que o coeficiente de correlação foi de $R^2 = 0,996$. Outros parâmetros de mérito como LOD e m_0 apresentaram valores de 4 ng e 3,4 ng de bromo, respectivamente.

A exatidão do método foi avaliada utilizando diferentes materiais de referência certificados e também comparando os resultados encontrados via HR-CS GF SS-MAS com os resultados encontrados utilizando a técnica SS-ETV-ICP-MS. Os resultados para as duas avaliações estão demonstrados na Tabela 11.

É possível observar que as concentrações de bromo encontradas para os CRMs BCR 181, BCR 182 e NIST 1630a, a partir de determinações utilizando HR-CS SS-GF MAS e calibração com padrões em solução não apresentaram diferença estatística segundo teste de *Tukey-Kramer* (nível de confiança de 95%), quando comparados com os valores encontrados por SS-ETV-ICP-MS e com os valores certificados. Similarmente, os resultados encontrados para a amostra NIST 1632b não apresentaram diferença significativa do valor informado pelo material, tanto para HR-CS SS-GF MAS como para SS-ETV-ICP-MS.

Tabela 10. Determinação de bromo em diferentes amostras certificadas de carvão utilizando HR-CS SS-GF MAS a partir de calibração utilizando padrões em solução em comparação com SS-ETV-ICP-MS. Os valores representam a média \pm SD (n = 5).

Amostra	Encontrado ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$)		Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	P
	GF MAS	ETV-ICP-MS		
BCR 181	36,7 \pm 1,5	38,4 \pm 5,3	37,3 \pm 0,1	0,50
BCR 182	40,8 \pm 2,4	Calibração*	39,7 \pm 0,7	0,35
NIST 1630 ^a	34,2 \pm 1,4	38,1 \pm 6,2	33,0 \pm 2,0	0,21
NIST 1632b	17,4 \pm 3,2	16,9 \pm 0,6	17 ^a	0,74

* utilizado para calibração quando ETV-ICP-MS foi empregado

^a valor informado

Fonte: (PEREIRA, CASTILHO, *et al.*, 2014).

4.3.6 Mecanismos envolvidos na formação da molécula CaBr

Os trabalhos que fazem uso de MAS para a determinação de moléculas em GF evidenciam que interações entre analito e reagente formador da molécula ocorram preferencialmente em fase gasosa. Embora, mesmo que muitos dos precursores para tais formações moleculares ocorram ainda em fase condensada, a etapa de pirólise possibilita a decomposição destes constituintes para então formarem as respectivas moléculas. Estas afirmações só são possíveis porque reagente formador e analito são misturados previamente às etapas envolvidas no programa de temperatura, dificultando a previsão dos diferentes mecanismos envolvidos na formação molecular. No entanto, neste trabalho, o reagente formador e o analito são separados ainda na fase condensada e esperava-se que a interação deles só viria a acontecer em fase gasosa após a volatilização dos dois componentes (cálcio e bromo).

No entanto, foram observados diferentes comportamentos nos sinais analíticos (duplos picos) resolvidos temporalmente (Figura 20) nos experimentos envolvendo padrão em solução em tubo de grafite e analito em plataforma. Em geral, duplos picos são observados em experimentos sem modificador químico ou em experimentos que utilizam baixa temperatura de pirólise, os quais acabam por desaparecer conforme essa temperatura de pirólise é aumentada. Entretanto, o que foi observado neste estudo foi exatamente o contrário. À medida que a temperatura de pirólise aumenta acima de 800 °C, um dos componentes (ou ambos) migra dentro do tubo de grafite (WELZ *et al.*, 1985; 1987). No caso de soluções contendo apenas KBr e Ca^{2+} na forma de acetato, espera-se que KBr, o qual possui ponto de fusão de 734 °C, migre para a região onde se encontra o reagente formador CaCO_3 , que possui ponto de fusão de 825 °C (FALBE *et al.*, 1989). Esta suposição é sustentada devido ao duplo pico que aparece em temperaturas maiores que 800 °C (Figura 20), pois a temperatura na parede do tubo de grafite é maior que a temperatura da plataforma. Esta diferença de temperatura permite que a pequena fração de bromo que migrou para a região da parede do tubo contendo Ca^{2+} forme a molécula CaBr antes da formação da molécula em fase gasosa.

Se temperaturas de pirólise de 800 °C são utilizadas, o duplo pico desaparece, evidenciando que a molécula CaBr está sendo formada em fase gasosa após a decomposição dos dois reagentes formadores estão sugerindo diferentes mecanismos de formação.

5 CONCLUSÕES PARTE I

No presente estudo, os resultados foram satisfatórios para as três metodologias desenvolvidas que fazem a determinação de flúor, cloro e bromo via HR-CS SS-GF MAS. No caso da determinação de flúor em amostras de carvão, a molécula CaF foi gerada em forno de grafite após a adição de excesso de Ca^{2+} em plataforma recoberta com paládio como modificador químico permanente. Para a determinação de cloro em amostras biológicas foi proposta uma nova molécula de SrCl, a qual foi inicialmente estudada utilizando TD-DFT para a obtenção do espectro de absorção para posterior abordagem experimental. Neste caso, o comprimento de onda de máxima absorção teórico (636,815 nm) foi muito próximo do experimental (635,862 nm), demonstrando que os cálculos utilizados descrevem com relativa certeza o comportamento da molécula em fase gasosa. Neste estudo, a máxima sensibilidade foi obtida utilizando zircônio como modificador químico permanente e com temperatura de vaporização de 2300 °C. Bromo foi determinado em amostras de carvão a partir da molécula CaBr e uma nova abordagem que permitiu a separação da amostra da solução formadora (Ca^{2+}). A introdução da solução formadora diretamente no tubo de grafite permitiu que a matriz fosse decomposta eficientemente sem levar à formação de compostos que permitissem eventuais perdas do reagente formador e inibissem a formação da molécula. Esta nova estratégia permitiu também que uma maior massa de amostra (por volta de 3 mg) fosse utilizada na SS, o que é um ótimo parâmetro quando a concentração do analito é muito reduzida. Todas as metodologias foram avaliadas utilizando diferentes CRMs e RMs. Além disso, no caso de cloro e bromo a técnica de SS-ETV-ICP-MS foi utilizada para comparação. Dentre os resultados obtidos não foram observadas diferenças significativas (nível de confiança de 95%) com nenhum dos materiais de referência ou com a técnica de comparação. Outro ponto muito importante das metodologias desenvolvidas para a determinação de flúor, cloro e bromo é a utilização de padrões aquosos para a construção das curvas de calibração, as quais são mais rápidas e econômicas quando comparadas às metodologias que utilizam CRM para calibração.

PARTE II – DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSENOLIPÍDEOS EM AMOSTRAS DE ÓLEO DE PEIXE

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Instrumentação

A determinação de arsênio total em óleo de peixe por HR-CS GF AAS foi feita utilizando um espectrômetro modelo 600 (Analytik Jena) já descrito na seção 3.1. Para todas as medidas foi utilizado o comprimento de onda de 193,696 nm e a absorvância integrada de três pixels (absorvância selecionada do volume do pico, PVSA, $A_{\Sigma 3, \text{int}}$).

Tubos de grafite recobertos piroliticamente com plataforma integrada (Analytik Jena, Part no. 407-A81.025) foram utilizados para todas as otimizações e determinações. O programa de temperatura otimizado para a determinação de arsênio total utilizando HG-CS GF AAS está mostrado na Tabela 11.

Tabela 11. Programa de temperatura utilizado para a determinação de arsênio total por HR-CS GF AAS a partir de soluções padrão ou análise direta de amostras diluídas em 1-propanol.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Permanência (s)
Secagem 1	110	50	20
Secagem 2	130	50	20
Pirólise	1400	50	10
Vaporização	2300	3000	5
Limpeza	2400	1000	4

Fonte: Autoria própria.

Para as investigações envolvendo análise de especiação de arsênio as medidas foram feitas utilizando um ESI-MS Orbitrap Discovery LTQ (Thermo Scientific, Alemanha) em modo positivo de varredura (resolução de 30 000) e um ICP-MS triplo quadrupolo 8800 (Agilent Technologies, EUA), operando em modo orgânico (cones de Pt), 10% de gás opcional (20% O₂ em Ar) e O₂ como gás reacional (2 mL min⁻¹). Para o monitoramento de arsênio o primeiro quadrupolo (Q1) foi configurado para monitorar a m/z 75, enquanto que o segundo quadrupolo (Q2) foi configurado para monitorar a m/z 91 referente à espécie ⁷⁵As¹⁶O⁺. Para o monitoramento de fósforo e enxofre, Q1 foi configurado para monitorar a m/z 31 e m/z 32, respectivamente, enquanto que o Q2 foi configurado para monitorar a m/z 47 e m/z 48, referentes às espécies ³¹P¹⁶O⁺ e ³²S¹⁶O⁺, respectivamente. Germânio (m/z 72) foi utilizado como padrão interno e foi monitorado utilizando Q1 e Q2 configurado para monitoramento de ⁷²Ge⁺.

Para a separação das espécies de arsenolipídeos foi utilizada uma coluna poroshell EC18 (2,7 μm, 4,6 x 150 mm) e 20 min de gradiente linear de 0 a 100% de metanol (ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e ácido fórmico 0,1% (v/v) em metanol), seguido de 20 min de 100% de metanol. Aproximadamente 75% do fluxo proveniente do HPLC foram injetados diretamente no ESI-MS enquanto os 25% sobressalente foram injetados no ICP-MS. A quantificação das espécies de arsênio utilizando ICP-MS foi feita a partir de espécies do ácido dimetilarsônico (DMA), proveniente de Acros Organics (GBR). Para isto, foi utilizado um procedimento de calibração descrito por Amayo *et al.* (AMAYO *et al.*, 2011) que utiliza a injeção pós-coluna de padrão de arsênio (⁷⁵As como DMA) e padrão interno (⁷²Ge) para estimar o fator de resposta (As_{fr}) de calibração. Este As_{fr} foi estimado em ordem de compensar a variação da linha de base em função do aumento de gradiente que causa o enriquecimento de carbono proveniente do solvente orgânico metanol.

6.2 Reagentes e materiais de referência

Todos os experimentos foram feitos utilizando água ultra pura (resistividade de 18 MΩ cm). Solução padrão de 1 g L⁻¹ de As, como ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsênico (Rox), ácido p-arsanílico (*p*-ASA), Ácido monometilarsênico (MMA), Ácido dimetilarsônico (DMA),

arsenato (As^{5+}) e arsenito (As^{3+}) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Soluções de 1 g L^{-1} de rutênio e irídio (Sigma-Aldrich) foram utilizados como modificadores permanentes enquanto que paládio (Fluka) como modificador químico em solução adicionado sobre a amostra.

Os solventes utilizados para as extrações das espécies de arsênio foram pelo menos de grau analítico e foram obtidos da Thermo Fisher Scientifics (EUA). Para o preparo de amostras envolvendo digestão assistida por radiação micro-ondas foi utilizado peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 32%) (Fluka) e ácido nítrico p.a (HNO_3 , 65%), obtido de Sigma-Aldrich. Os eluentes empregados nas separações cromatográficas foram metanol (Thermo Fisher Scientifics), carbonato de amônio (Sigma-Aldrich) e ácido fórmico (Fluka). Para a avaliação da exatidão no uso de procedimentos envolvendo digestão assistida por radiação micro-ondas foi utilizado como material de referência certificado o material DORM-3 (músculo de peixe, $6,80 \pm 0,64 \text{ mg g}^{-1}$ de As), da National Research Council Canada (NRCC).

6.3 Amostras

As amostras de óleo de peixe, bem como o material utilizado para a extração das espécies de arsênio provenientes de óleo de peixe, denominado aqui bentonita, são provenientes da empresa Golden Omega S.A., Arica, Chile. O óleo é coletado a partir de peixe de espécies não específicas, mas que possuem em maior quantidade a espécie anchoveta Peruana (*Engraulis ringens*), coletada no oceano Pacífico.

No óleo extraído utilizando prensa hidráulica (Amostra A - óleo bruto) foi adicionado bentonita (Tonsil 126 FF, Süd-Chemie, Munique) para extração e remoção de contaminantes. A bentonita contendo os contaminantes adsorvidos foi separada, estocada em frascos de vidro e direcionada ao laboratório para posterior manipulação envolvendo extração e/ou preparo de amostra. Já o óleo remanescente foi direcionado a diferentes processos de purificação envolvendo destilação e foram denominados como sendo: Amostra B – fração limpa (rica em ômega-3); Amostra C – resíduo (proveniente da destilação); Amostra D – produto final. O material foi mantido em $4 \text{ }^\circ\text{C}$ quando não manipulado e o tempo total entre coleta e extração foi de uma semana.

6.4 Procedimento para a determinação de arsênio total utilizando HR-CS GF AAS

Inicialmente, 0,5 g de cada amostra de óleo de peixe (A-D) foram diluídas para 5 mL de 1-propanol com o objetivo de reduzir a viscosidade da amostra. Volumes de 10 e 30 µL da amostra diluída foram transferidas para a plataforma do tubo de grafite previamente tratada com 400 µg (10 injeções de 40 µL contendo 40 µg) de rutênio ou irídio. Em alguns casos, 10 µL de solução de paládio foram pipetados sobre a amostra ou sobre a solução padrão e submetidos ao programa de aquecimento. O uso de 1-propanol como diluente de amostras com alto teor lipídico foi proposto por Chaves *et al.* (CHAVES *et al.*, 2011) na determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn em amostras de biodiesel e vegetais utilizando a técnica de ICP OES.

6.5 Procedimento para a digestão assistida por radiação micro-ondas

Para avaliação da exatidão do método proposto, as amostras de óleo de peixe foram ainda submetidas ao procedimento de digestão assistida por radiação micro-ondas utilizando um equipamento TOPwave (Analytik Jena), com controle de pressão e temperatura dos oito frascos de trabalho. Aproximadamente 0,3 g de amostra de óleo de peixe foram transferidas para os frascos PTFE e foram adicionados uma mistura de 5,0 mL de ácido nítrico concentrado e 3 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). Os frascos foram fechados e posicionados para o programa de temperatura descrito na Tabela 12. Os extratos provenientes da digestão foram aferidos a 15 mL com água ultrapura para posterior determinação de arsênio total utilizando HR-CS GF AAS e ICP-MS.

Tabela 12. Temperatura e programa de pressão utilizados para a digestão de aproximadamente 0,3 g de amostra de óleo de peixe e uma mistura de 5 mL de HNO₃ concentrado e 3 mL de H₂O₂ 30% (m/m).

Etapas	01	02	03
Temperatura (°C)	145	170	200
Pressão (bar)	40	40	40
Potência (%)	40	70	80
Rampa (°C min ⁻¹)	2	5	2
Time (min)	10	5	20

Fonte: Autoria própria.

6.6 Procedimentos para extração sequencial dos compostos

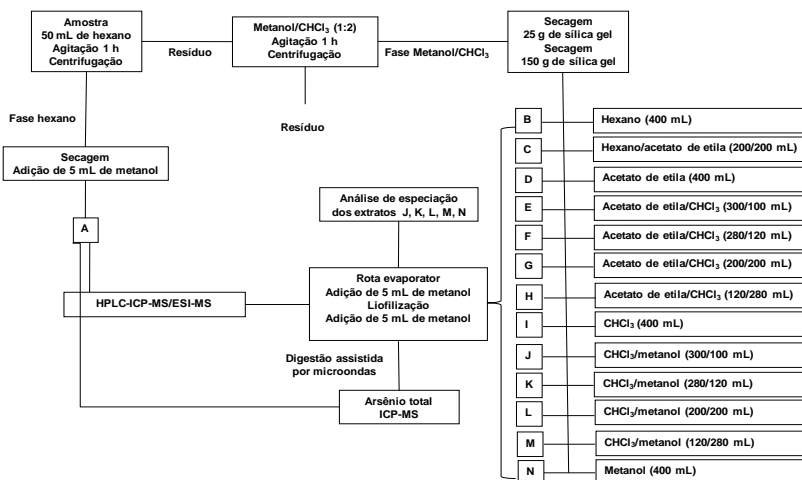
Inicialmente, 5 g de material bentonita contendo os constituintes adsorvidos foram submetidos a diferentes etapas de extração, das quais o sobrenadante foi removido e o resíduo submetido à etapa de extração subsequente. A sequência utilizada para extração foi: adição de 50 mL de hexano; seguida de adição de 60 mL de metanol/clorofórmio (1 : 2 v/v); 50 mL de metanol, e 50 mL de água ultrapura. Todas as fases foram submetidas a uma etapa de agitação (700 r.p.m durante 60 min), centrifugação (3000 r.p.m durante 10 min) e posterior secagem. Então, em cada extrato foi adicionado 1 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ para digestão assistida por radiação micro-ondas utilizando o seguinte programa de temperatura: 5 min em 50 °C; 5 min em 75 °C; e 25 min em 95 °C. Os extratos provenientes das digestões foram diluídos para 30 mL utilizando água ultrapura e a concentração total de As foi determinada por ICP-MS.

6.7 Procedimentos para o fracionamento utilizando coluna preparativa

O extrato obtido utilizando a mistura de metanol/clorofórmio (seção 6.6), foi submetido a diferentes etapas de fracionamento utilizando coluna preparativa recheada com aproximadamente 150 g de sílica gel (0,063 - 0,200 mm). O fracionamento foi feito utilizando diferentes solventes, tais como hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol, bem como a mistura deles, no intuito de aumentar ou diminuir

a força de eluição. Um esquema detalhado de todos os procedimentos envolvidos na etapa de fracionamento está demonstrado na Figura 21. Cada extrato resultante (B – N) foi submetido a uma etapa de secagem utilizando rota evaporador, liofilizado e então diluído utilizando 5 mL de metanol. A partir de cada fração obtida, foi feita a identificação das espécies de arsênio utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS e quantificação por ICP-MS após digestão assistida por radiação micro-ondas. O extrato proveniente da etapa de extração utilizando apenas hexano (seção 5.4), também foi submetido aos procedimentos descritos acima, no entanto, o extrato foi apenas seco em ar comprimido e diluído utilizando 5 mL de metanol (fração A).

Figura 21. Esquema do fracionamento e identificação das espécies de arsênio utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS.



Fonte: Autoria própria.

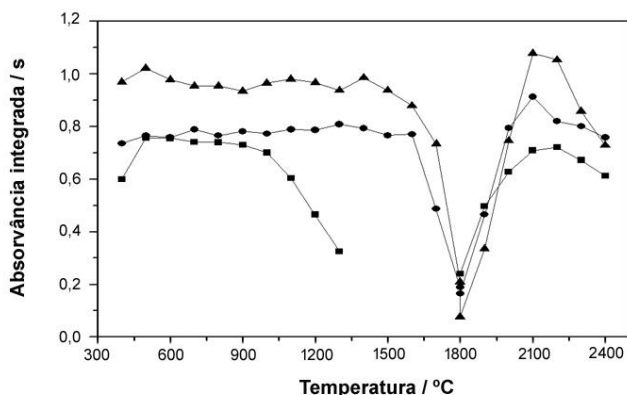
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Determinação de arsênio total por HR-CS GF AAS

7.1.1 Otimização das temperaturas de pirólise e atomização para solução padrão

Inicialmente as temperaturas de pirólise e atomização foram avaliadas utilizando soluções padrão de arsênio (10 ng de As^{3+}) pipetadas em plataforma de grafite recoberta com irídio ou rutênio como modificadores químicos permanentes bem como em plataforma sem recobrimento. As curvas de pirólise e atomização para as três condições estão mostradas na Figura 22.

Figura 22. Curvas de pirólise e atomização para 10 ng de arsênio (10 μL de uma solução contendo 1 mg L^{-1} de As^{3+}). A temperatura de atomização foi fixada em 2200 °C para a otimização das temperaturas de pirólise, enquanto que, para a otimização a temperatura de atomização, as temperaturas de pirólise foram fixadas em 900 °C para plataforma sem modificador (■), 1400 °C para Ir (▲) ou Ru (●).



Fonte: (PEREIRA, DE ALMEIDA, *et al.*, 2016).

Para estes estudos utilizando arsênio em solução, a máxima temperatura de pirólise para os modificadores irídio e rutênio foi em torno de 1500 °C. No entanto, plataforma de grafite recoberta com irídio apresentou maior sensibilidade quando comparado com plataforma recoberta com rutênio e plataforma sem recobrimento. A temperatura

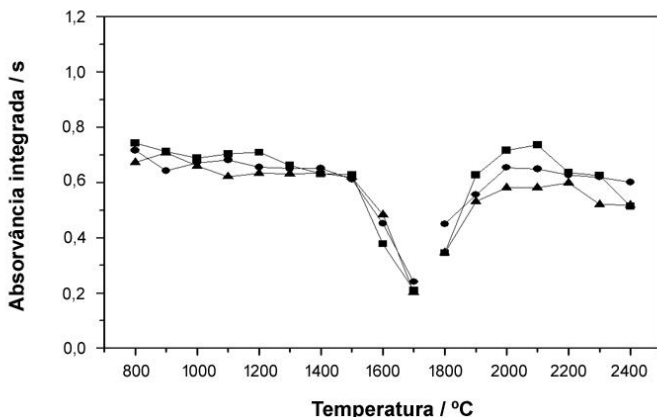
máxima de pirólise alcançada sem perda do analito para os experimentos realizados em plataforma sem recobrimento não excedeu 900 °C, demonstrando a eficiência dos modificadores químicos depositados eletro termicamente.

O comportamento do arsênio em plataforma de grafite sem recobrimento tem sido discutido na literatura (HUSAKOVA *et al.*, 2007; TÖRÖK *et al.*, 2010; DE JESUS *et al.*, 2012) e é explicado pela penetração líquida do analito nos poros do grafite pirólítico. Este efeito leva à formação de carbetos intersticiais analito-carbono, os quais possuem alta volatilidade. Esta volatilidade explica a baixa temperatura de pirólise (900 °C) alcançada com plataforma de grafite sem recobrimento. Por outro lado, rutênio e irídio são metais pertencentes ao grupo da platina com pontos de ebulição de 2310 °C e 2410 °C, respectivamente, e formam compostos de intercalação com o grafite da plataforma (L'VOV, 2000; VOLYNSKY, 2000; ORTNER *et al.*, 2002), agindo entre o analito e o grafite prevenindo a formação do carbeto volátil. Este efeito pode ser observado pelas altas temperaturas de pirólise (1500 °C) alcançadas quando os modificadores são empregados.

7.1.2 Otimização das temperaturas de pirólise e atomização para amostras de óleo de peixe

A próxima etapa foi avaliar o comportamento do analito proveniente da amostra de óleo de peixe frente às curvas de pirólise e atomização utilizando plataforma de grafite recoberta com rutênio e irídio bem como plataforma sem recobrimento. Apesar de a plataforma de grafite não tratada ter apresentado relativa baixa temperatura de pirólise no experimento utilizando solução padrão, essa hipótese não foi descartada, pois para as três avaliações (rutênio, irídio e plataforma sem recobrimento) a sensibilidade foi similar. Os resultados para as otimizações das curvas de pirólise e atomização envolvendo amostra de óleo de peixe estão mostrados na Figura 23.

Figura 23. Curvas de pirólise e atomização obtidas a partir de 20 μL de solução (0,5 g de Amostra A diluído para 5 mL com 1-propanol). Para a otimização das temperaturas de pirólise, a temperatura de atomização foi fixada em 2200 $^{\circ}\text{C}$; para a otimização das temperaturas de atomização, as temperaturas de pirólise foram fixadas em 1200 $^{\circ}\text{C}$ para plataforma sem recobrimento (■) e 1500 $^{\circ}\text{C}$ para irídio (▲) ou rutênio (●).



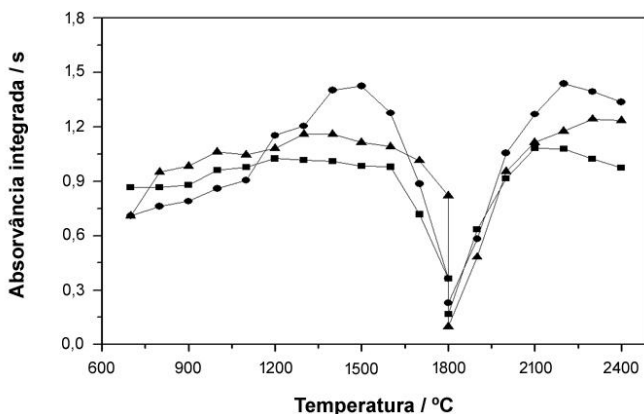
Fonte: (PEREIRA, DE ALMEIDA, *et al.*, 2016).

A partir da Figura 23 é possível observar que o comportamento do analito foi diferente daquele em solução padrão. Neste caso, as curvas de pirólise e atomização foram semelhantes para as três condições experimentais (rutênio, irídio e plataforma sem recobrimento), com temperaturas máximas em torno de 1500 $^{\circ}\text{C}$. A possível explicação para a maior temperatura sem perda do analito utilizando plataforma sem recobrimento pode estar nas diferentes formas que o arsênio se encontra na matriz lipídica.

Os experimentos utilizando padrões em solução foram feitos a partir de uma solução contendo espécie de arsênio inorgânico (As^{3+}) conhecida por penetrar nos poros do grafite pirolítico. No entanto, as espécies presentes na amostra de óleo de peixe podem conter grupamentos orgânicos ligados aos respectivos átomos de arsênio (AMRAN *et al.*, 1997; TALESCHI *et al.*, 2008; AMAYO *et al.*, 2013), inviabilizando a formação de carbetos voláteis. Outra suposição está na influência dos componentes da própria matriz atuando como modificadores químicos na estabilidade do arsênio no tubo de grafite.

Comparando as curvas de pirólise e atomização encontradas para o analito proveniente de uma solução padrão e da amostra (Amostra A), é possível observar que o comportamento das espécies orgânicas e inorgânicas varia de acordo com a condição experimental empregada (plataforma sem recobrimento e plataforma recoberta com rutênio ou irídio). Sendo assim, foi avaliada a estratégia de se utilizar paládio em solução como modificador químico em conjunto com os demais modificadores permanentes, bem como com plataforma sem recobrimento. As curvas de pirólise e atomização para as três novas condições estão mostradas na Figura 24.

Figura 24. Curvas de pirólise e atomização obtidas a partir de 20 μL de solução (0,5 g de amostra A diluído para 5 mL com 1-propanol) e 10 μg de paládio (10 μL de uma solução contendo 10 g L^{-1} de Pd). Para a otimização das temperaturas de pirólise, a temperatura de atomização foi fixada em 2200 $^{\circ}\text{C}$; para a otimização das temperaturas de atomização as temperaturas de pirólise foram fixadas em 1500 $^{\circ}\text{C}$ para plataforma sem recobrimento (■), 1400 $^{\circ}\text{C}$ para irídio (▲) e 1500 $^{\circ}\text{C}$ para rutênio (●).



Fonte: (PEREIRA, DE ALMEIDA, *et al.*, 2016).

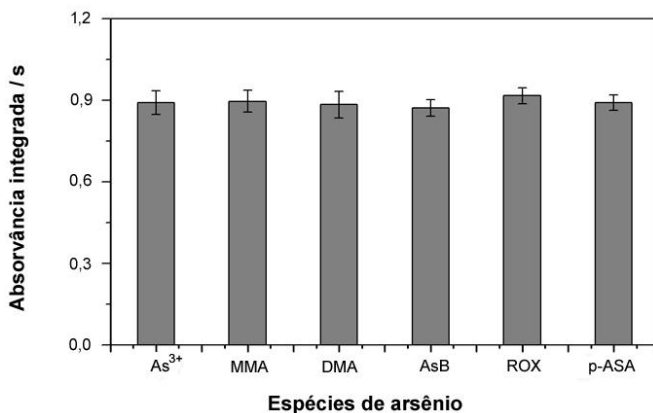
O uso de paládio em solução em conjunto com a plataforma de grafite recoberta com rutênio demonstrou melhores resultados dentre as

três condições avaliadas. Mesmo que plataforma sem recobrimento e plataforma recoberta com irídio forneçam temperaturas de pirólise em torno de 1400 °C, a sensibilidade deles para uma mesma massa de analito ainda é menor que aquela encontrada ao fazer a combinação de rutênio e paládio. A temperatura de atomização para as três condições foi em torno de 2300 °C, reafirmando a hipótese de maior sensibilidade devido ao efeito dos modificadores empregados.

Parece evidente que o paládio em solução estabiliza o arsênio enquanto que o rutênio (modificador permanente) previne a interação carbono-analito, reduzindo a formação de carbetos voláteis e perda do analito na etapa de pirólise. Cabe ressaltar ainda que o paládio inibe a formação de carbetos em fase condensada, o que contribui para o emprego de maiores temperaturas de pirólise (VOLYNSKY, 2000). Para avaliar o efeito da combinação rutênio-paládio na estabilização de diferentes espécies de arsênio (orgânicas e inorgânicas), um novo estudo foi iniciado utilizando As^{3+} , MMA, DMA, AsB, p-ASA e ROX nas mesmas condições encontradas com os experimento anterior (plataforma recoberta com rutênio, adição de paládio sobre a amostra e temperaturas de pirólise e atomização de 1400 °C e 2300 °C, respectivamente). Os resultados podem ser vistos na Figura 25.

Para todas as avaliações utilizando uma massa de 10 ng das diferentes espécies de arsênio nenhuma diferença significativa em relação ao sinal analítico (absorvância integrada) foi observada (teste *t-student*, nível de confiança de 95%). Os resultados demonstraram que o comportamento das espécies de arsênio avaliadas (orgânicas e inorgânicas) foram condicionadas de forma muito semelhante quando rutênio como modificador permanente e paládio como modificador em solução foram empregados conjuntamente dentro das condições de temperaturas otimizadas. Esta observação permitiu que a curva de calibração fosse feita a partir de soluções padrão de As^{3+} ou de qualquer uma das espécies avaliadas.

Figura 25. Sinais analíticos para 10 ng de arsênio (10 μL de soluções contendo 1 mg L^{-1}) de arsenito - As^{3+} , ácido monometilarsênico – MMA, ácido dimetilarsônico – DMA, arsenobetaína – AsB, ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsênico – ROX e ácido p-arsanílico - p-ASA. Condições: plataforma de grafite recoberta com 400 μg de rutênio (10 injeções de 40 μL contendo 40 μg); 10 μg de paládio (10 μL de uma solução contendo 1 g L^{-1} de Pd) adicionados sobre a amostra; temperatura de pirólise e atomização de 1400 ° e 2300 °C, respectivamente.



Fonte: (PEREIRA, DE ALMEIDA, *et al.*, 2016).

7.1.3 Calibração e parâmetros de mérito

A curva de calibração utilizando soluções padrão de As^{3+} foi investigada e a faixa linear de trabalho foi entre 0,10 e 15,0 ng de arsênio com coeficiente angular de $0,1035 \text{ ng}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e coeficiente de correlação de 0,999. O LOD e LOQ encontrados foram de 30 pg e 100 pg de As ou $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, considerando a injeção de 10 μL de uma solução de 0,5 g de amostra diluídas para 5 mL com 1-propanol. LOD e LOQ foram calculados como 3 e $10\sigma/S$ ($n = 10$), respectivamente, onde σ é o desvio padrão de 10 medidas do branco e S é a

medida de inclinação da curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de As^{3+} . A m_o foi de 43 pg de As e foi estimada como sendo a massa do analito capaz de causar uma absorvância integrada correspondente a 0,0044 s e ($A_{\text{int}} = 0,0044$ s/S). Um resumo dos parâmetros de méritos está mostrado na Tabela 12.

Tabela 13. Parâmetros de mérito encontrados para a determinação de arsênio utilizando HR-CS GF AAS e curva de calibração a partir de solução padrão.

Parâmetro	Valor
Limite de detecção, pg	30
Limite de detecção*, $\mu\text{g g}^{-1}$	0,03
Limite de quantificação, pg	100
Limite de quantificação*, $\mu\text{g g}^{-1}$	0,1
Massa característica, pg	43
Correlação linear, R^2	0,999
Faixa de trabalho, ng	0,10 – 15,0

*estimados a partir da diluição de 500 mg de amostra para 5 mL de 1-propanol e injeção de 10 μL de solução pipetadas no forno de grafite.

Fonte: Autoria própria.

O LOD absoluto encontrado neste trabalho é similar àquele encontrado por Bermejo-Barrera *et al.* (BERMEJO-BARRERA *et al.*, 1998) que faz a determinação de arsênio em água do mar por GF AAS utilizando dois corretores de fundo: lâmpada de deutério (LOD - 24 pg de As) e efeito Zeeman (LOD - 32 pg de As). No entanto, Bermejo-Barrera *et al.* utilizaram apenas paládio como modificador químico adicionado sobre a amostra. Resultado similar foi encontrado por Husáková *et al.* (HUSAKOVA *et al.*, 2007) na determinação de arsênio em cerveja utilizando GF AAS com uma lâmpada de deutério como corretor de fundo e também paládio em solução como modificador químico. Nestas condições, Husáková *et al.* encontraram um LOD de 23 pg de As.

7.1.4 Determinação de arsênio total em óleo de peixe por HR-CS GF AAS e ICP-MS

A partir das otimizações feitas para o método proposto (rutênio como modificador permanente e paládio em solução adicionado sobre a amostra), foi possível fazer a determinação de arsênio total em quatro amostras de óleo de peixe (A – D) utilizando HR-CS GF AAS e apenas uma diluição da amostra em 1-propanol. Para a comparação dos resultados e avaliação da exatidão, as amostras de óleo de peixe foram digeridas em sistema fechado (digestão assistida por radiação micro-ondas) e a determinação de arsênio total nos extratos digeridos foi realizada utilizando HR-CS GF AAS (programa otimizado anteriormente) e a técnica de ICP-MS. Os resultados das três avaliações estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Determinação de arsênio total em amostras de óleo de peixe por HR-CS GF AAS a partir de injeção direta e extrato digerido por radiação micro-ondas e por ICP-MS utilizando extratos digeridos por radiação micro-ondas (n=3).

Amostra	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$)			p
	GF AAS	GF AAS ¹	ICP-MS ¹	
A	10,6 ± 1,3	10,3 ± 1,3	10,0 ± 0,6	0,72
B	0,17 ± 0,04	< 0,49 ²	0,23 ± 0,03	0,11
C	0,18 ± 0,02	< 0,49 ²	0,19 ± 0,01	0,48
D	< 0,10 ³	< 0,49 ²	< 0,10	-

¹ Extratos provenientes da digestão assistida por radiação micro-ondas.

² LOQ (10 σ /S, n = 10), considerando 300 mg de amostra e diluição para 15 mL com água ultrapura e volume de 10 μL pipetados no forno de grafite.

³ LOQ (10 σ /S, n = 10), considerando 500 mg de amostra diluídas para 5 mL com 1-propanol e volume de 10 μL pipetados no forno de grafite.

Fonte: (PEREIRA, DE ALMEIDA, *et al.*, 2016).

As concentrações de arsênio total encontradas nas amostras de óleo de peixe não apresentaram diferença significativa (test *t-student* com um nível de confiança de 95%) quando comparadas com os valores encontrados utilizando extratos digeridos e HR-CS GF AAS ou determinações por ICP-MS.

A amostra A (óleo bruto) foi a que apresentou maiores teores de arsênio total ($10,6 \pm 1,3 \mu\text{g g}^{-1}$) utilizando a técnica de injeção direta e determinação por HR-CS GF AAS. Estas concentrações foram confirmadas comparando-as com os extratos digeridos e determinados por HR-CS GF MAS e ICP-MS, que foram $10,3 \pm 1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ e $10,0 \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. As amostras B e C apresentaram concentrações similares de arsênio total ($0,18 \mu\text{g g}^{-1}$) utilizando injeção direta e determinação por HR-CS GF AAS e ICP-MS. No entanto, para quantificação de arsênio total a partir dos extratos digeridos e determinação por HR-CS GF AAS as concentrações foram inferiores ao LOQ do método ($< 0,49 \mu\text{g g}^{-1}$).

As baixas concentrações de arsênio total nas Amostras B e C em comparação com a amostra A, corroboram com o fato das Amostras B e C serem subprodutos de etapas de purificação que envolve destilação e o emprego de materiais adsorventes utilizados no processo industrial. Fato este reforçado pelas concentrações de arsênio total encontradas na Amostra D (produto final), as quais foram abaixo de $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ e não pôde ser detectada por nenhum dos três métodos supracitados.

A concordância entre os resultados encontrados utilizando HR-CS GF AAS para a determinação de arsênio total em amostras diluídas em 1-propanol e em extratos digeridos (HR-CS GF MAS e ICP-MS), demonstram que o comportamento de diferentes espécies de arsênio em GF é bastante similar quando rutênio é utilizado como modificador permanente e paládio como modificador em solução. O óleo de peixe é uma matriz complexa e contém uma variedade de espécies de arsênio, dentre elas arsenollipídeos (AsFA e AsHC) (AMAYO *et al.*, 2013), as quais são responsáveis por até 35% do teor total de arsênio nestas amostras lipídicas (SELE *et al.*, 2013).

7.2 Determinação de arsênio total nas frações provenientes da extração sequencial

Dos extratos obtidos utilizando diferentes solventes para extração das espécies de arsênio a mistura metanol/clorofórmio (1:2 v/v) foi a que apresentou maiores concentrações de arsênio total (43%, $129 \mu\text{g}$

g^{-1}), seguida do resíduo (34%, $102 \mu\text{g g}^{-1}$), extração com água (16%, $49 \mu\text{g g}^{-1}$), metanol (6%, $17 \mu\text{g g}^{-1}$) e hexano 0,4% ($1,2 \mu\text{g g}^{-1}$). A mistura de metanol com um solvente de maior apolaridade (clorofórmio) tem sido empregada com sucesso na extração de hidrocarbonetos e fosfolipídios (AMAYO *et al.*, 2011; RAAB *et al.*, 2013), demonstrando que estes compostos possuem polaridade intermediária, pois não são eficientemente extraídos com hexano (apolar) e tão pouco extraídos com metanol (baixa polaridade).

Em relação às altas concentrações de arsênio presentes no resíduo da extração sequencial, fica evidente que espécies de arsênio (como cátions ou ânions) foram adsorvidas irreversivelmente pela estrutura porosa que compõe a bentonita (BOURG *et al.*, 2003). O uso da digestão assistida por radiação micro-ondas possibilitou essa quebra de interação e, espécies de arsênio antes aderidas, puderam ser disponibilizadas em solução para quantificação.

7.2.1 Identificação das espécies de arsênio nos extratos fracionados

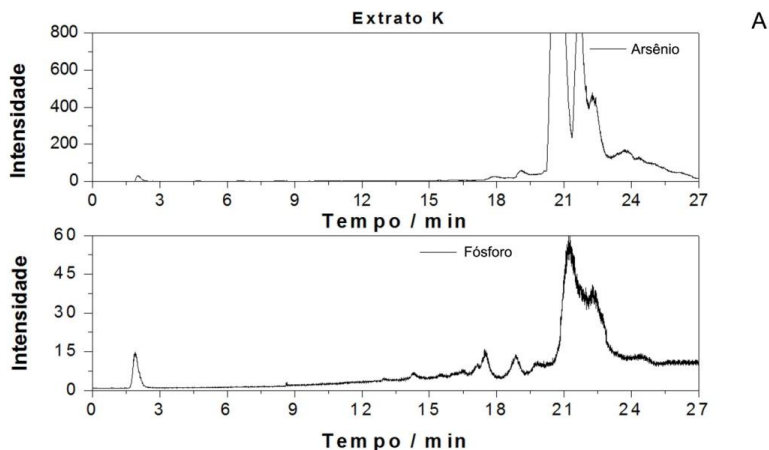
Devido às altas concentrações de arsênio encontradas nos extratos provenientes da mistura metanol/clorofórmio (43%), o próximo passo foi a identificação desses compostos utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS. No entanto, foi observado que a identificação dos espectros de massa provenientes da fonte eletrospray (ESI-MS) foi prejudicada devido à supressão de ionização causada por espécies orgânicas que coeluíram com o analito. Esses interferentes, tais como fosfolipídios e compostos contendo enxofre, possuem polaridades muito similares aos compostos de arsênio, causando assim forte interferência na etapa de identificação.

Para contornar essa interferência, uma adaptação utilizando coluna preparativa empacotada com sílica gel foi feita com o intuito de isolar os compostos de arsênio das espécies interferentes com a máxima eficiência. Desta forma, o extrato contendo a maior concentração de arsênio (metanol/clorofórmio, 1:2 v/v) foi submetido a sucessivas etapas de fracionamento utilizando diferentes misturas de solventes alterando, assim, a polaridade da fase móvel. Todos os extratos obtidos utilizando o fracionamento puderam então ser separados e identificados por HPLC-ESI-MS. A adaptação utilizando coluna preparativa de fase normal foi feita a partir de trabalhos descritos por Arroyo-Abad *et al.* (ARROYO-

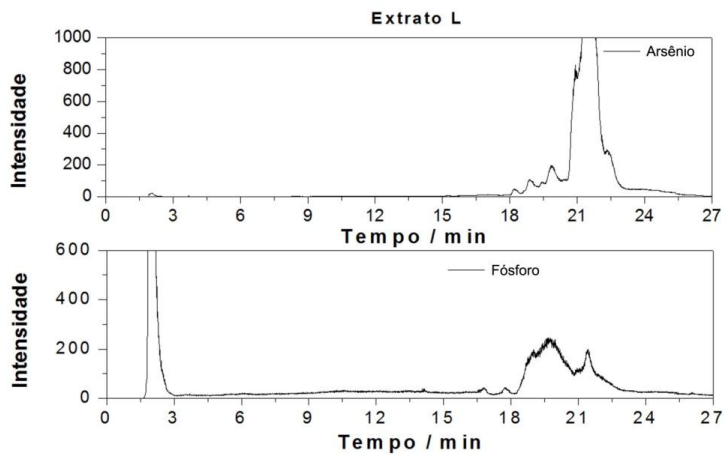
ABAD *et al.*, 2010) e Lischka *et al.* (LISCHKA *et al.*, 2013), na identificação de espécies de arsênio em tecido de fígado de bacalhau e filé de arenque, respectivamente.

A partir da determinação de arsênio nos diferentes extratos (A - N) via ICP-MS foi verificado que espécies de arsênio foram detectadas apenas a partir do extrato K, que é o fracionamento utilizando a mistura clorofórmio/metanol 2:1 v/v. No entanto, verificou-se também a partir do monitoramento de fósforo que ocorreram significativas coeluições destes compostos com as espécies de arsênio e as mesmas foram suprimidas apenas a partir do extrato M (Figura 26). O extrato N também foi responsável pelo maior número de compostos de arsênio entre os extratos avaliados entre 6 e 20 min de corrida cromatográfica, não sendo observado espécies de fósforo neste intervalo.

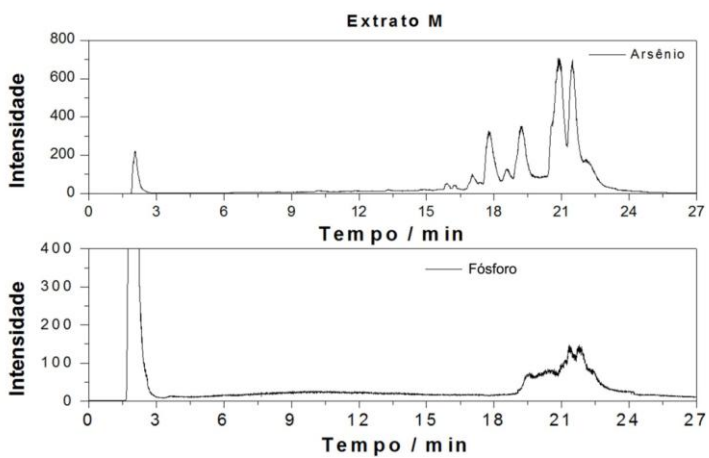
Figura 26. Cromatogramas obtidos no monitoramento de espécies de arsênio e fósforo a partir de HPLC-ICP-MS para os diferentes extratos K (A), L (B), M (C) e N (D) provenientes do fracionamento utilizando coluna de fase normal, misturas de clorofórmio/metanol com porções de 2:1 (v/v), 1:1 (v/v), 1:2 (v/v) e metanol.

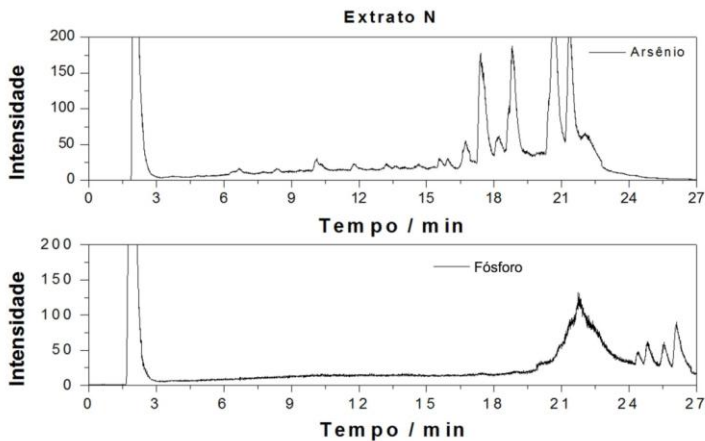


B



C





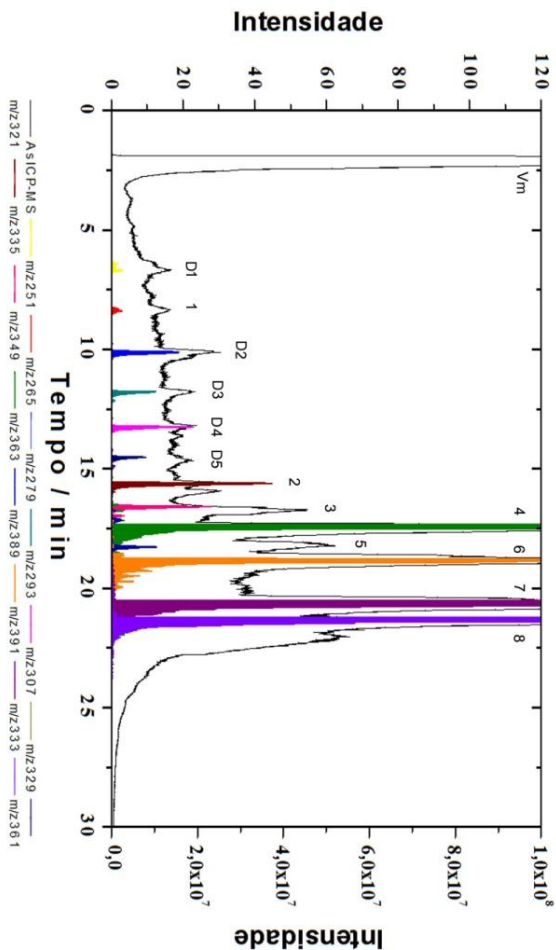
D

Fonte: (PEREIRA, KOPP, *et al.*, 2016).

Devido à diminuta coeluição causada por compostos de fósforo e variável número de espécies de arsênio observadas nos extratos M e N, estes foram escolhidos para serem avaliados utilizando ESI-MS acoplado à ICP-MS. A partir da Figura 27 é possível observar simultaneamente os diferentes picos cromatográficos provenientes do extrato N no monitoramento de arsênio por ICP-MS (D1 – D5) e 1 – 6, bem como a detecção dos picos moleculares protonados obtidos por ESI-MS, ambos entre 5 e 10 min de corrida cromatográfica e mesmas condições de separação. Nos Apêndices 3-7 estão os espectros de íons positivos obtidos utilizando ESI-MS dos compostos D1 – D5.

A partir da correlação dos espectros de massa provenientes da ESI-MS e dos picos cromatográficos encontrados via ICP-MS, foi possível identificar sete espécies AsFA e duas espécies de AsHC, correspondentes aos picos 7 e 8, respectivamente, da Figura 27. Em relação aos AsFA encontrados entre 5 e 15 min de análise, cabe ressaltar que 5 deles são ácidos graxos desconhecidos até então e estão identificados na Figura 27 segundo a ordem D1 – D5, enquanto que suas fórmulas moleculares e massa calculada/encontrada estão descritas na Tabela 15 juntamente com os demais compostos.

Figura 27. Cromatogramas obtidos para as espécies de arsênio provenientes da fração N utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS. Os números dos respectivos picos cromatográficos correspondem às fórmulas moleculares listadas na Tabela 15.



Fonte: (PEREIRA, KOPP, *et al.*, 2016).

Tabela 15. Fórmula molecular, massa experimental e calculada, erro relativo e recuperação para os diferentes compostos identificados por HPLC-ICP-MS/ESI-MS em modo positivo $[M+H]^+$ a partir do extrato N. A recuperação descrita (R%) foi calculada em relação à concentração total das espécies de arsênio encontradas no extrato N.

Composto	Fórmula química	m/z _{exp}	m/z _{calc}	Íon fragmentado	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	R (%)
D1	C ₉ H ₁₉ AsO ₃	251,0622	251,0623	104,9680	-0,2	0,05
				102,9521		
				122,9782		
1	C ₁₀ H ₂₂ AsO ₃	265,0778	265,0779	104,9680	-0,4	0,07
				122,9782		
D2	C ₁₁ H ₂₄ AsO ₃	279,0932	279,0935	90,9154	-1,1	0,18
				102,9521		
				104,9680		
				122,9782		
D3	C ₁₂ H ₂₆ AsO ₃	293,1087	293,1092	90,9154	-1,7	0,08
				102,9521		
				104,9680		
				122,9782		
D4	C ₁₃ H ₂₈ AsO ₃	307,1244	307,1248	90,9154	-1,3	0,07
				104,9680		
				122,9782		
D5	C ₁₄ H ₃₀ AsO ₃	321,1396	321,1405	102,9521	-2,8	0,09
				104,9680		
				122,9782		

Tabela 15 (continuação)

Composto	Fórmula química	m/z _{exp}	m/z _{calc}	Íon fragmentado	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	R (%)
2	C ₁₅ H ₃₂ AsO ₃	335,1555	335,1561	102,9521	-1,8	0,10
				104,9680		
				122,9782		
3	C ₁₆ H ₃₄ AsO ₃	349,1710	349,1718	102,9521	-2,3	0,6
				104,9680		
				122,9782		
4	C ₁₇ H ₃₆ AsO ₃	363,1868	363,1874	102,9521	-1,6	3,9
				104,9680		
				122,9782		
5	C ₁₉ H ₃₈ AsO ₃	389,2020	389,2031	104,9680	-2,8	1,1
				122,9782		
6	C ₁₉ H ₄₀ AsO ₃	391,2177	391,2187	104,9680	-2,5	4,0
				122,9782		
7	C ₁₇ H ₃₈ AsO	333,2122	333,2133	90,9154	-3,3	48
				102,9521		
				104,9680		
				122,9782		
8	C ₁₉ H ₄₂ AsO	361,2435	361,2446	90,9154	-3,0	20
				102,9521		
				104,9680		
				122,9782		
Volume morto	-	-	-	-	-	6,5

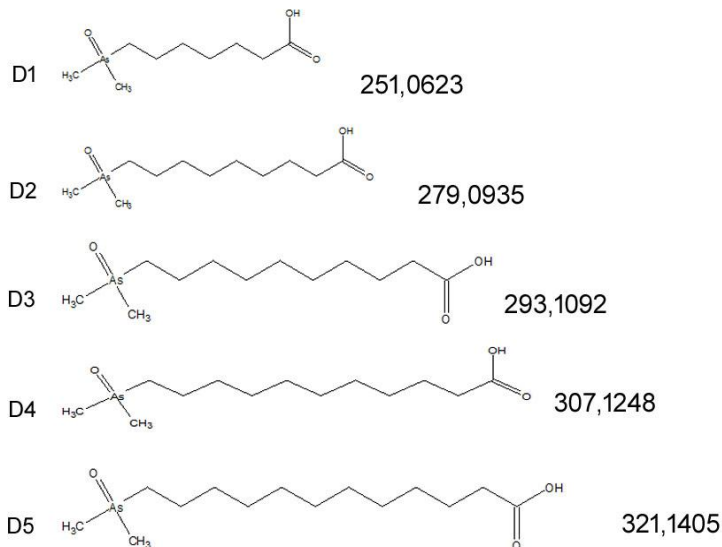
Fonte: (PEREIRA, KOPP, *et al.*, 2016).

Os AsFA de massa 250 ($C_9H_{19}AsO_3 - [M+H]^+$ calculado: 251,0622; encontrado: 251,0623; Δm : -0,2 ppm), 278 ($C_{11}H_{24}AsO_3 - [M+H]^+$ calculado: 279,0935; encontrado: 279,0932; Δm : -0,4 ppm) e 292 ($C_{12}H_{26}AsO_3 - [M+H]^+$ calculado: 293,1092; encontrado: 293,1087; Δm : -1,7 ppm), foram identificados como espécies de AsFA de cadeia média (As-MCFA), enquanto que os compostos de massa 306 ($C_{13}H_{28}AsO_3 - [M+H]^+$ calculado: 307,1248; encontrado: 307,1244; Δm : -1,3 ppm) e 320 ($C_{14}H_{30}AsO_3 - [M+H]^+$ calculado: 321,1405; encontrado: 321,1396; Δm : -2,8 ppm), foram identificados como AsFA de cadeia longa (As-LCFA) e não foram reportados até agora em óleo de peixe.

Adicionalmente, os íons de m/z 90,91 (AsO^+), m/z 102,95 ($(CH_2)_2As^+$), m/z 104,96 (CH_2AsO^+) e m/z 122,97 ($CH_4AsO_2^+$), identificados a partir da função MS/MS, permitiram confirmar que os picos moleculares eram compostos contendo arsênio e suas estruturas puderam então ser propostas (Figura 28).

As espécies AsHC de massa molecular 332 ($C_{17}H_{38}AsO$, pico 7 da Figura 27) e 360 ($C_{19}H_{42}AsO$, pico 8 da Figura 27) foram os compostos que apresentaram maiores concentrações em relação às demais espécies, sendo 48% e 20%, respectivamente. Essas duas espécies têm sido muito bem identificadas por outros autores em amostras de óleo de peixe (TALESHI *et al.*, 2008; AMAYO *et al.*, 2011), tecido de peixe (ARROYO-ABAD *et al.*, 2013) e alga marrom (RAAB *et al.*, 2013), os quais todos utilizaram HPLC-ICP-MS acoplado a ESI-MS.

Figura 28. Estruturas moleculares propostas para as espécies de AsLip desconhecidas (D1 – D5), bem como as massas moleculares teóricas $[M+H]^+$ identificadas na fração clorofórmio/metanol do extrato purificado em coluna de fase normal.



Fonte: (PEREIRA, KOPP, *et al.*, 2016).

7.2.2 Quantificação das espécies de arsênio utilizando HPLC-ICP-MS

As concentrações de arsênio encontradas utilizando separação cromatográfica seguida de determinação por ICP-MS foram comparadas com as concentrações encontradas utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas, a qual disponibiliza a informação da concentração total de arsênio presente nos extratos avaliados (K – N). As recuperações encontradas para a soma das espécies de arsênio foram entre 89% e 95% quando comparadas com o procedimento utilizando digestão, sendo que as maiores concentrações foram encontradas nos extratos K e L. A boa concordância entre os dois procedimentos demonstra que as perdas das espécies de arsênio devido às diferentes

etapas de extração, purificação e análise de especiação foram mínimas para o procedimento adotado.

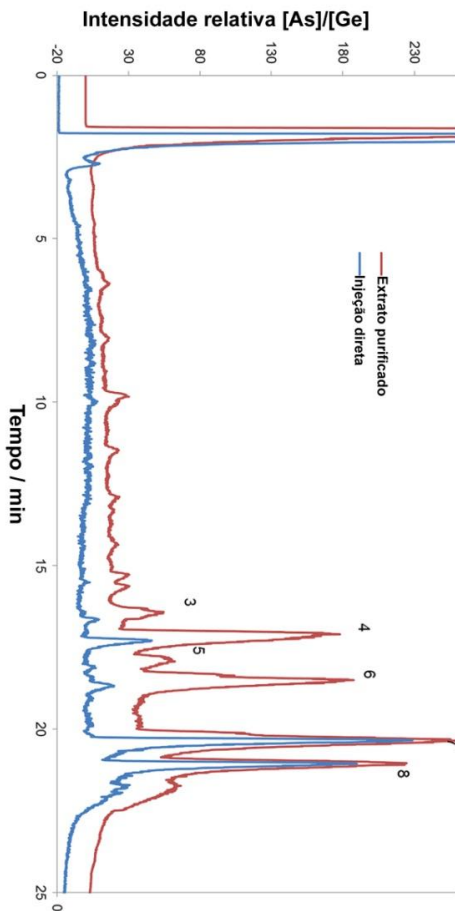
A identificação e quantificação das espécies de arsênio foram possíveis devido a dois fatores: primeiro, a etapa de pré-concentração por conta das propriedades da bentonita que favorece a adsorção de espécies de arsênio; segundo, devido à etapa de pré-concentração e purificação adquirida com a utilização de coluna de sílica gel e o fracionamento com diferentes solventes de extração, os quais puderam ser evaporados, favorecendo a pré-concentração das espécies. Estes fatores permitiram a determinação das espécies de arsênio de massa 250, 264, 278, 292, 306, 320, 334 e 348 (AsFA), os quais foram encontrados em concentrações entre $0,0043 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,0526 \mu\text{g g}^{-1}$. Outras espécies de AsFA, tais como 362, 388, 390 e espécies de AsHC, tais como 333 e 361, mostraram concentrações entre 0,3 e $4,2 \mu\text{g g}^{-1}$.

O CRM DORM-3, o qual possui valor certificado de $6,80 \pm 0,64 \mu\text{g g}^{-1}$ de arsênio, foi utilizado para assegurar a exatidão do procedimento utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas, e teve a concentração encontrada de $6,97 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ de As, fornecendo uma recuperação de 102% ($n = 5$) entre o valor certificado e encontrado. O branco do material bentonita também foi avaliado e o sinal analítico encontrado foi menor que o LOQ do método ($< 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$).

7.2.3 Integridade e toxicidade das espécies de arsênio

A determinação e identificação de cinco novas espécies de arsênio presentes em amostras de óleo de peixe está relacionada com o tipo de amostra utilizada para as extrações. Por se tratar de uma amostra proveniente de espécies de peixes não selecionadas, espera-se que a diversidade dos compostos presentes seja de grande variedade desde que, diferentes espécies de peixe, possuem diferentes rotas de metabolismo. No entanto, as espécies de As-MCFA não são, de forma geral, extraídas utilizando uma mistura de metanol/clorofórmio como a utilizada neste trabalho. Estas espécies apresentam maior caráter polar e deveriam ser extraídas apenas quando metanol fosse utilizado como extrator (fração N). Na Figura 29 é possível observar os cromatogramas obtidos para os extratos provenientes das sucessivas etapas de purificação comparado com um extrato de metanol sem passar pela etapa de fracionamento com sílica gel.

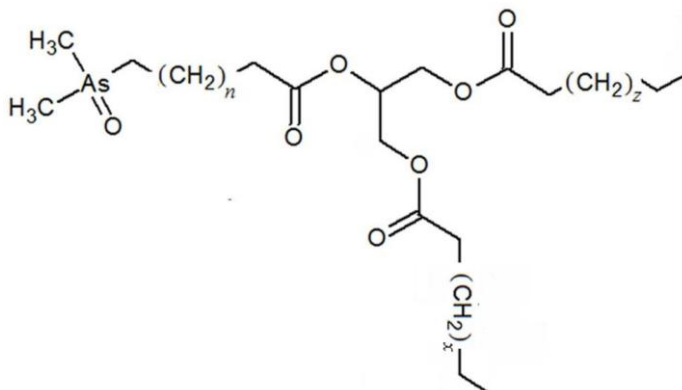
Figura 29. Cromatograma obtido utilizando HPLC-ICP-MS/ESI-MS e 2 g de amostra bentonita extraída a partir de 5 mL de metanol, agitadas por 2 minutos e injetada diretamente sem etapa de purificação em comparação ao cromatograma obtido para o extrato N (purificado). Os números 3 - 8 referentes aos picos cromatográficos são os mesmos identificados na Figura 27.



Fonte: (PEREIRA, KOPP, *et al.*, 2016).

Isto serve como indício de que as espécies As-MCFA foram extraídas inicialmente em uma forma diferente, neste caso, possivelmente como triglicerídeo (Figura 30). Esta proposta foi inicialmente feita por Taleshi *et al.* (TALESHI *et al.*, 2014) na extração e identificação de espécies de arsênio presentes em amostras de óleo de peixe *Micromesistius poutassou*. Assim como no trabalho de Taleshi *et al.*, as espécies de As-MCFA extraídas inicialmente como triglicerídeos foram hidrolisadas durante as etapas de fracionamento devido às diferentes forças de eluição ao longo do experimento utilizando coluna de sílica gel.

Figura 30. Estrutura proposta para um triglicerídeo contendo arsênio. Os subscritos n, x e z representam os números de carbonos em cada cadeia.



Fonte: (PEREIRA, KOPP, *et al.*, 2016).

Em termos de toxicidade, as espécies majoritárias encontradas nas amostras de óleo foram espécies de AsHC de massa molecular 360 e 332, e apresentam toxicidade semelhante à espécies de As³⁺ (MEYER *et al.*, 2015). Espécies de As-LCFA apresentam baixa toxicidade comparada à AsHC (MEYER *et al.*, 2014) enquanto que espécies de As-MCFA não possuem toxicidade avaliada. Estas novas informações relacionadas ao estudo de As-MCFA provenientes de triglicerídeos podem ser de extrema importância para entender a química destes compostos no corpo humano, já que podem ser rapidamente hidrolisados pelas lipases pancreáticas após a sua ingestão e então metabolizados como ácidos graxos livres (TAKEUCHI *et al.*, 2008).

8 CONCLUSÕES PARTE II

O presente trabalho descreveu, nesta segunda parte, o desenvolvimento de uma nova metodologia para a determinação de arsênio total em amostras de óleo de peixe utilizando HR-CS GF AAS. As amostras não foram submetidas a etapas prévias de preparo de amostras, mas apenas diluídas com 1-propanol para redução da viscosidade. A combinação de rutênio como modificador permanente e paládio, adicionado em solução sobre a amostra, permitiu que as curvas de calibração fossem preparadas a partir de solução padrão pipetadas diretamente no forno de grafite. Nestas condições, o limite de detecção e a massa característica foram determinados (30 pg e 43 pg, respectivamente). A exatidão da metodologia foi avaliada utilizando digestão ácida assistida por radiação micro-ondas com posterior determinação via HR-CS GF AAS e ICP-MS e não demonstraram diferenças significativas (nível de 95% de confiança) entre as metodologias avaliadas. Cabe ressaltar que diferentes espécies de arsênio (orgânicas e inorgânicas) foram avaliadas nas condições otimizadas e apresentaram um comportamento bastante similar quando comparadas com a espécie As^{3+} utilizada para o preparo das curvas de calibração.

Ainda, na segunda parte do presente trabalho, a partir de estratégias de extração e purificação utilizando cromatografia em fase normal e RP-HPLC-ICP-MS/ESI-MS foi possível a identificação de treze espécies de arsenolípídeos em amostras de óleo de peixe, sendo duas espécies de AsHC e dez espécies de AsFA. Dentre as espécies de AsFA cinco espécies de massas moleculares de 250, 278, 292, 306 e 320 não haviam sido identificadas até o momento, sendo classificadas como AsFA de cadeia média (250 e 278) e AsFA de cadeia longa (292, 306 e 320). O sucesso deste trabalho na identificação de novas espécies de arsênio está na estratégia adotada utilizando cromatografia em fase normal de sílica gel, estratégia esta que reduziu interferências causadas por compostos de lipofilicidade similar às espécies de arsênio deste estudo, os quais poderiam interferir na etapa de identificação ao se utilizar a técnica de ESI-MS. A alta concentração de arsênio na fase extratora clorofórmio/metanol (43%) bem como a identificação de

espécies de arsênio de cadeia média nos extratos purificados corrobora com a especulação de que espécies de arsênio estão conjugadas com estruturas de alto peso molecular, tais como triglicerídeos, desde que espécies de cadeia média não ocorrem no ambiente como ácidos graxos livres. Entende-se desta forma que esteja ocorrendo a hidrólise dessas espécies de arsênio ao longo do processo de purificação utilizando cromatografia em fase normal com sílica gel, tornando a identificação dessas espécies de arsênio um desafio analítico. Esta hipótese abre um novo horizonte para estudos posteriores envolvendo espécies lipofílicas de arsênio, pois as espécies de arsênio de cadeia média podem apresentar diferentes rotas de absorção em sistemas biológicos, causando desta forma efeitos adversos desconhecidos até então.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAIGÉS, J. Pradyot Patnaik, Handbook of environmental analysis. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, p. 1557-1557, 2013.

AMAYO, K. O. et al. Identification and quantification of arsenolipids using reversed-phase HPLC coupled simultaneously to high-resolution ICPMS and high-resolution electrospray MS without species-specific standards. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 3589-3595, 2011.

AMAYO, K. O. et al. Identification of arsenolipids and their degradation products in cod-liver oil. **Talanta**, v. 118, p. 217-223, 2014.

AMAYO, K. O. et al. Novel identification of arsenolipids using chemical derivatizations in conjunction with RP-HPLC-ICPMS/ESMS. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 9321-9327, 2013.

AMRAN, M. B.; LAGARDE, F.; LEROY, M. J. F. Determination of Arsenic Species in Marine Organisms by HPLC-ICP-OES and HPLC-HG-QFAAS. **Mikrochimica Acta**, v. 127, p. 195-202, 1997.

ARROYO-ABAD, U. et al. Determination and identification of hydrophilic and hydrophobic arsenic species in methanol extract of fresh cod liver by RP-HPLC with simultaneous ICP-MS and ESI-Q-TOF-MS detection. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3093-3102, 2013.

ARROYO-ABAD, U. et al. Detection of arsenic-containing hydrocarbons in canned cod liver tissue. **Talanta**, v. 82, p. 38-43, 2010.

ARROYO-ABAD, U. et al. Determination of moderately polar arsenolipids and mercury speciation in freshwater fish of the River Elbe (Saxony, Germany). **Environmental Pollution**, v. 208, p. 458-466, 2016.

ATSDR. **Toxicological Profile for Arsenic**. Atlanta, GA; 2007b. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp2.pdf>. 2007.

BARDACH, A. E. et al. Epidemiology of chronic disease related to arsenic in Argentina: A systematic review. **Science of The Total Environment**, v. 538, p. 802-816, 2015.

BAUMBACH, G.; EINAX, J. W. Determination of sulfur in coal by solid sampling graphite furnace high-resolution molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 89-93, 2014.

BAUMBACH, G.; LIMBURG, T.; EINAX, J. W. Quantitative determination of sulfur by high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 295-299, 2013.

BAYSAL, A.; AKMAN, S. A practical method for the determination of sulphur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 2662-2665, 2011.

BECHLIN, M. A.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 134-138, 2013.

BENTLEY, R.; CHASTEEN, T. G. Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 250-271, 2002.

BERMEJO-BARRERA, P. et al. Direct Determination of Arsenic in Sea Water by Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry using D2 and Zeeman Background Correction. **Mikrochimica Acta**, v. 128, p. 215-221, 1998.

BETTINELLI, M. Determination of fluorine in environmental standard reference materials with a fluoride ion-selective electrode. **Analyst**, v. 108, p. 404-407, 1983.

BIERLA, K. et al. Speciation of Selenium in Selenium-Enriched Sunflower Oil by High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry/Electrospray-Orbitrap Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 4975-4981, 2016.

BORGES, A. R. et al. Determination of fluorine in plant materials via calcium mono-fluoride using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry with direct solid sample introduction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, p. 1564, 2014.

BORGES, D. L. G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, p. 58-67, 2005.

BOURG, I. C.; BOURG, A. C. M.; SPOSITO, G. Modeling diffusion and adsorption in compacted bentonite: A critical review. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 61, p. 293-302, 2003.

BOZEMAN, W. P.; DILBERO, D.; SCHAUBEN, J. L. Biologic and chemical weapons of mass destruction. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 20, p. 975-993, 2002.

BRANDAO, G. C.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C. The chemical generation of NO for the determination of nitrite by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry. **Talanta**, v. 98, p. 231-235, 2012.

BRANDAO, G. C. et al. Development of a simple method for the determination of nitrite and nitrate in groundwater by high-resolution continuum source electrothermal molecular absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 806, p. 101-106, 2014.

BUTCHER, D. J. Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 1-15, 2013.

CAO, Y. et al. Selenium speciation in radix puerariae using ultrasonic assisted extraction combined with reversed phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry after magnetic solid-phase extraction with 5-sulfosalicylic acid functionalized magnetic nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 122, p. 172-177, 2016.

CHAPMAN, A. C. On the presence of compounds of arsenic in marine crustaceans and shell fish. **Analyst**, v. 51, p. 548-563, 1926.

CHAVES, E. S. et al. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, p. 733-739, 2011.

CHUNG, C.-J. et al. Urinary arsenic profiles and the risks of cancer mortality: A population-based 20-year follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. **Environmental Research**, v. 122, p. 25-30, 2013.

CHUNG, Y.-L. et al. Arsenic in drinking and lung cancer mortality in Taiwan. **Journal of Asian Earth Sciences**, v. 77, p. 327-331, 2013.

CIFTCI, H.; ER, C. Solid-phase extraction and separation procedure for trace aluminum in water samples and its determination by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR-CS FAAS). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 2745-2753, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

DE CAMPOS, R. C. et al. Direct determination of P in biodiesel by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, p. 352-355, 2011.

DE JESUS, A. et al. Determination of arsenic and cadmium in crude oil by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 71-72, p. 86-91, 2012.

DEBORDE, M.; VON GUNTEN, U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—Kinetics and mechanisms: A critical review. **Water Research**, v. 42, p. 13-51, 2008.

DESSUY, M. B. et al. Investigation of phosphorus atomization using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, p. 429-434, 2007.

DITTRICH, K.; HANISCH, B.; STÄRK, H. J. Molecule formation in electrothermal atomizers: Interferences and analytical possibilities by absorption, emission and fluorescence processes. **Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 324, p. 497-506, 1986.

DITTRICH, K.; SHKINEV, V. M.; SPIVAKOV, B. V. Molecular absorption spectrometry (MAS) by electrothermal evaporation in a graphite-furnace-XIII. determination of traces of fluoride by mas of aif after liquid liquid extraction of fluoride with triphenylantimony (v) dihydroxide. **Talanta**, v. 32, p. 1019-1022, 1985.

DITTRICH, K. et al. Molecular absorption spectrometry (MAS) by electrothermal evaporation in a graphite-furnace .9. Determination of traces of bromide by MAS of AlBr after liquid liquid extraction of bromide with triphenyltin hydroxide. **Talanta**, v. 31, p. 39-44, 1984a.

DITTRICH, K. et al. Molecular absorption spectrometry by electrothermal evaporation in the graphite-furnace .10. Determination of chloride traces by alcl ma in graphite cuvettes after liquid liquid extraction of chloride with triphenyltin hydroxide. **Talanta**, v. 31, p. 341-345, 1984b.

DITTRICH, K. et al. Determination of some nonmetals by using diatomic molecular absorbance in a hot graphite-furnace. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 39, p. 349-363, 1984.

DRESSLER, V. L. et al. Determination of fluoride in coal using pyrohydrolysis for analyte separation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 334-338, 2003.

ENDERS, M. S. P. et al. Determination of Chlorine in Crude Oil by High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry Using AlCl, InCl, and SrCl Molecules. **Energy and Fuels**, v. 30, p. 3637-3643, 2016.

FALBE, J.; REGITZ, M. **Römpp Chemie Lexikon, vol. 1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1989, p. 551.** 1989.

FECHETIA, M.; TOGNON, A. L.; DA VEIGA, M. A. M. S. Determination of chlorine in food samples via the AlCl molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 71-72, p. 98-101, 2012.

FERNÁNDEZ, M. I. et al. Long-Term Impact of Arsenic in Drinking Water on Bladder Cancer Health Care and Mortality Rates 20 Years After End of Exposure. **The Journal of Urology**, v. 187, p. 856-861, 2012.

FIGUEIREDO, B. R. et al. Medical Geology Studies in South America. In: SELINUS, O.; FINKELMAN, R. B., *et al* (Ed.). **Medical Geology: A Regional Synthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p.79-106. ISBN 978-90-481-3430-4.

FLORA, S. J. S. 1 - Arsenic: Chemistry, Occurrence, and Exposure. In: (Ed.). **Handbook of Arsenic Toxicology**. Oxford: Academic Press, 2015. p.1-49. ISBN 978-0-12-418688-0.

FLORES, É. L. M. et al. A new approach for fluorine determination by solid sampling graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, p. 918-923, 2007.

FLORES, E. M. M. et al. Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 1865-1870, 2008.

FLÓREZ, M. R.; RESANO, M. Direct determination of bromine in plastic materials by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 32-39, 2013.

FRANCESCONI, K. A. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. **Pure & Applied Chemistry**, v. 82, p. 373-381, 2010.

GAO, X. et al. Colorimetric detection of fluoride in an aqueous solution using Zr(IV)-EDTA complex and a novel hemicyanine dye. **Talanta**, v. 73, p. 770-775, 2007.

GARCÍA-SALGADO, S.; RABER, G.; FRANCESCONI, K. A. Arsenic-containing lipids in five species of edible algae. One Century of the Discovery of Arsenicosis in Latin America (1914-2014): As 2014 - Proceedings of the 5th International Congress on Arsenic in the Environment, 2014. p.389-391.

GARCÍA-SALGADO, S. et al. Arsenosugar phospholipids and arsenic hydrocarbons in two species of brown macroalgae. **Environmental Chemistry**, v. 9, p. 63-66, 2012.

GLEISNER, H. et al. A fast and accurate method for the determination of total and soluble fluorine in toothpaste using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and its comparison with established techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 1040-1046, 2011.

GLEISNER, H.; WELZ, B.; EINAX, J. W. Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, p. 864-869, 2010.

GOIS, J. S. et al. Simultaneous determination of bromine and chlorine in coal using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and direct solid sample analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 852, p. 82-87, 2014.

GOIS, J. S. et al. Application of direct solid sample analysis for the determination of chlorine in biological materials using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 105, p. 12-17, 2015.

GROBENSKI, Z. et al. Improvements in graphite furnace atomic absorption microanalysis with solid sampling. **Microchimica Acta**, v. 1, p. 115-125, 1982.

GUARDA, A. et al. Determination of chlorine via the CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Talanta**, v. 162, p. 354-361, 2017.

GUNDUZ, S.; AKMAN, S. Investigation of lead contents in lipsticks by solid sampling high resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, p. 34-37, 2013.

GUNDUZ, S.; AKMAN, S. Sulfur determination in some nuts and dried fruits sold in Turkey by high resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 718-723, 2014.

HARAGUCHI, H.; FUWA, K. Atomic and molecular absorption-spectra of indium in air-acetylene flame. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 30, p. 535-545, 1975.

HEEB, M. B. et al. Oxidative treatment of bromide-containing waters: Formation of bromine and its reactions with inorganic and organic compounds — A critical review. **Water Research**, v. 48, p. 15-42, 2014.

HEITMANN, U. et al. Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption

spectrometry and graphite furnace atomization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, p. 1314, 2006.

HEITMANN, U. et al. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, p. 1222-1230, 2007.

HU, Q. et al. The Orbitrap: A new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 430-443, 2005.

HUANG, M. D. et al. Direct determination of total sulfur in wine using a continuum-source atomic-absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1877-1881, 2005.

HUANG, M. D. et al. Determination of halogens via molecules in the air-acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry: Part I. Fluorine. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 572-578, 2006a.

HUANG, M. D. et al. Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 181-188, 2006b.

HUANG, M. D. et al. High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, p. 566-570, 2008.

HUSAKOVA, L. et al. Direct determination of arsenic in beer by electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction (D2-ET-AAS). **Food Chemistry**, v. 105, p. 286-292, 2007.

JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S., v. Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Blackie, New York, 1992, 380 p,

KONIECZKA, P.; ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Comparison of fluoride ion-selective electrode based potentiometric methods of fluoride determination in human urine. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 794-803, 2000.

KOVAČEVIČ, M. et al. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry to phospholipid analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 80-84, 2004.

KOWALEWSKA, Z. Feasibility of high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in flame and furnace for sulphur determination in petroleum products. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, p. 546-556, 2011.

KRÜGER, M. et al. Quantification of the fluorine containing drug 5-fluorouracil in cancer cells by GaF molecular absorption via high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 69, p. 50-55, 2012.

L'VOV, B. V. Method of absolute reaction rates supports the desorption mechanism of the release of sub-nanogram masses of analytes from graphite and platinum group modifier surfaces. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, p. 1913-1919, 2000.

LAURSEN, J. et al. Elements in Autopsy Liver Tissue Samples from Greenlandic Inuit and Danes. I. Sulphur, Chlorine, Potassium and Bromine measured by X-ray Fluorescence Spectrometry. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 12, p. 109-114, 1998.

LEPRI, F. G. et al. Investigation of chemical modifiers for phosphorus in a graphite furnace using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 934-944, 2006.

LIMBURG, T.; EINAX, J. W. Determination of bromine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Microchemical Journal**, v. 107, p. 31-36, 2013.

LISCHKA, S. et al. The high diversity of arsenolipids in herring fillet (*Clupea harengus*). **Talanta**, v. 110, 2013.

LIU, G. et al. Environmental geochemistry and health of fluorine in Chinese coals. **Environmental Geology**, v. 52, p. 1307-1313, 2006.

LUNDE, G. Analysis of Arsenic in Marine Oils by Neutron Activation. Evidence of Arseno Organic Compounds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 331-332, 1968.

MACHADO, P. M. et al. Fluorine determination in coal using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 105, p. 18-24, 2015.

MACHYŇÁK, E. et al. Determination of trace concentrations of chlorine in aqueous solutions by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 125, p. 140-145, 2016.

MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 1156-1162, 2000.

MELLO, P. A. et al. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7615-7642, 2013.

MEYER, S. et al. In vitro toxicological characterisation of three arsenic-containing hydrocarbons. **Metallomics**, v. 6, p. 1023-1033, 2014.

MEYER, S. et al. In vitro toxicological characterisation of arsenic-containing fatty acids and three of their metabolites. **Toxicology Research**, v. 4, p. 1289-1296, 2015.

MORE, K. R.; CORNELL, S. D. The Band Spectra of SrCl and SrH. **Physical Review**, v. 53, p. 806–811 1938.

MORÉS, S. et al. Determination of fluorine in tea using high-resolution molecular absorption spectrometry with electrothermal vaporization of the calcium mono-fluoride CaF. **Talanta**, v. 85, p. 2681-2685, 2011.

MORITA, M.; SHIBATA, Y. Isolation and identification of arseno-lipid from a brown alga, *Undaria pinnatifida* (Wakame). **Chemosphere**, v. 17, p. 1147-1152, 1988.

NOGUCHI, Y. et al. Simultaneous determination of fluorine, chlorine and bromine in cement with ion chromatography after pyrolysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 640, p. 106-109, 2009.

ORTNER, H. M. et al. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry—mechanisms of action (A tutorial review). **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 1835-1853, 2002.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Method development for the determination of fluorine in toothpaste via molecular absorption of aluminum mono fluoride using a high-resolution continuum source nitrous oxide/acetylene flame atomic absorption spectrophotometer. **Talanta**, v. 94, p. 246-250, 2012a.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Method development for the determination of fluorine in water samples via the molecular absorption of strontium monofluoride formed in an electrothermal atomizer. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 69, p. 32-37, 2012b.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Determination of fluorine in milk samples via calcium-monofluoride by electrothermal molecular absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 650-654, 2013.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Determination of fluorine in milk and water via molecular absorption of barium monofluoride by high-resolution

continuum source atomic absorption spectrometer. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 111-115, 2014.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Determination of fluorine in Turkish wines by molecular absorbance of CaF using a high resolution continuum source atomic absorption spectrometer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 112-116, 2015.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Solid sampling determination of total fluorine in baby food samples by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 211, p. 180-184, 2016.

PAVELKA, S. et al. Impact of high bromide intake in the rat dam on iodine transfer to the sucklings. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1041-1045, 2002.

PEREIRA, É. R. et al. Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 96, p. 33-39, 2014.

PEREIRA, É. R. et al. Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 150, p. 142-147, 2016.

PEREIRA, É. R. et al. Arsenic containing medium and long chain fatty acids in marine fish oil identified as degradation products using reversed-phase HPLC-ICP-MS/ ESI-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 1836–1845, 2016.

PEREIRA, É. R. et al. Strontium mono-chloride — A new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis.

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, v. 102, p. 1-6, 2014.

PETURSDOTTIR, A. H. et al. Environmental effects on arsenosugars and arsenolipids in *Ectocarpus* (Phaeophyta). **Environmental Chemistry**, v. 13, p. 21-33, 2016.

PLASUS. **Plasus Specline, software version 2.1, Plasus Ingenieurbüro, Königsbrunn, 1998** 1998.

RAAB, A. et al. Comprehensive analysis of lipophilic arsenic species in a brown alga (*Saccharina latissima*). **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 2817-2824, 2013.

RABER, G. et al. Identification of arsenolipids with GC/MS. **Talanta**, v. 78, p. 1215-1218, 2009.

RAGGI, M. A. et al. Determination of bromine traces in sodium diclofenac, using X-ray fluorescence spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 8, p. 975-978, 1990.

REBELO, F. M.; CALDAS, E. D. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. **Environmental Research**, v. 151, p. 671-688, 2016.

RELLO, L. et al. A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 81, p. 11-19, 2013.

RESANO, M. et al. Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of silver at trace and ultratrace levels. **Analytica Chimica Acta**, v. 571, p. 142-149, 2006.

RUIZ-CHANCHO, M. J. et al. A method for screening arsenolipids in fish oils by HPLC-ICPMS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, p. 501-504, 2012.

RUMPLER, A. et al. Arsenic-containing long-chain fatty acids in cod-liver oil: A result of biosynthetic infidelity? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, p. 2665-2667, 2008.

SABATH, E. 18 - Arsenic, Kidney, and Urinary Bladder Disorders A2 - Flora, S.J.S. In: (Ed.). **Handbook of Arsenic Toxicology**. Oxford: Academic Press, 2015. p.429-442. ISBN 978-0-12-418688-0.

SÁNCHEZ-RODAS, D. et al. Speciation analysis of Se-enriched strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) cultivated on hydroponics by HPLC-TR-HG-AFS. **Microchemical Journal**, v. 127, p. 120-124, 2016.

SCHMEISSER, E.; GOESSLER, W.; FRANCESCONI, K. A. Human metabolism of arsenolipids present in cod liver. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 367-376, 2006.

SCHMEISSER, E. et al. Direct measurement of lipid-soluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICPMS. **Analyst**, v. 130, p. 948-955, 2005.

SCHÜTZE-PAHLMANN, H. U. et al. Millimeter wave spectra of the 2Σ radicals SrF and SrCl. **Chemical Physics Letters**, v. 93, p. 74-77, 1982.

SELE, V. et al. Detection of arsenic-containing hydrocarbons in a range of commercial fish oils by GC-ICPMS analysis ABC Highlights: Authored by Rising Stars and Top Experts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5179-5190, 2013.

SELE, V. et al. Arsenic-containing fatty acids and hydrocarbons in marine oils - Determination using reversed-phase HPLC-ICP-MS and HPLC-qTOF-MS. **Talanta**, v. 121, p. 89-96, 2014.

SILVA, A. F. et al. Method development for the determination of thallium in coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with continuum source, high-resolution monochromator and CCD array detector. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 59, p. 841-850, 2004.

STURGEON, W. T.; HARRISCO, R. M.; DAMS, R. Development of a technique for the determination of lead and bromine in atmospheric particles by x-ray fluorescence. **Atmospheric Environment**, v. 19, p. 1495-1502, 1985.

TAKEUCHI, H. et al. The application of medium-chain fatty acids: Edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, p. 320-323, 2008.

TALESHI, M. S. et al. Arsenic-containing hydrocarbons: Natural compounds in oil from the fish capelin, *Mallotus villosus*. **Chemical Communications**, p. 4706-4707, 2008.

TALESHI, M. S. et al. Arsenolipids in oil from blue whiting *Micromesistius poutassou* - Evidence for arsenic-containing esters. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.

TEMPLETON, D. M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, p. 1453-1470, 2000.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS: Part I. **Spectroscopy**, v. 16, p. 38-43, 2001.

TÖRÖK, P.; ŽEMBERYOVÁ, M. Utilization of W/Mg(NO₃)₂ modifiers for the direct determination of As and Sb in soils, sewage sludge and sediments by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, p. 291-296, 2010.

TSUJI, J. S. et al. Arsenic exposure and bladder cancer: Quantitative assessment of studies in human populations to detect risks at low doses. **Toxicology**, v. 317, p. 17-30, 2014.

VALE, M. G. R. et al. Method development for the determination of nickel in petroleum using line-source and high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 77, p. 131-140, 2004.

VIRGILIO, A. et al. Evaluation of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct determination of chromium in medicinal plants. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 78, p. 58-61, 2012.

VOLYNSKY, A. B. Mechanisms of action of platinum group modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, p. 103-150, 2000.

VOLYNSKY, A. B. Comparative efficacy of platinum group metal modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 59, p. 1799-1821, 2004.

WELZ, B.; AKMAN, S.; SCHLEMMER, G. Investigations of interferences in graphite furnace atomic-absorption spectrometry using a dual cavity platform part 1. Influence of nickel chloride on the determination of antimony. **The Analyst**, v. 110, p. 459-465, 1985.

WELZ, B.; AKMAN, S.; SCHLEMMER, G. Investigations of interferences in graphite furnace atomic absorption spectrometry using a dual-cavity platform. Part 2. Influence of sodium chloride and nickel chloride on the atomisation of lead. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 2, p. 793-799, 1987.

WELZ, B. et al. **High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry**. 2006. 1-295

WELZ, B. et al. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry - What can we expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 220-229, 2003.

WELZ, B. et al. Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, p. 137-148, 2009.

WELZ, B. et al. Continuum source atomic absorption spectrometry: Past, present and future aspects-a critical review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 799-821, 2014.

WELZ, B. et al. Investigation of interferences in the determination of thallium in marine sediment reference materials using high-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry and electrothermal atomization. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 1043-1055, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds. 2nd ed. Geneva, Suíça, 2001, 501 p.

XU, M. Status of trace element emission in a coal combustion process: a review. **Fuel Processing Technology**, v. 85, p. 215-237, 2004.

YUNG, Y. L. et al. Atmospheric bromine and ozone perturbations in the lower stratosphere. **Journal of the Atmospheric Sciences**, v. 37, p. 339-353, 1980.

ZHANG, J. et al. Preliminary study of trace element emissions and control during coal combustion. **Frontiers of Energy and Power Engineering in China**, v. 1, p. 273-279, 2007.

ZHU, C.-Q. et al. A colorimetric method for fluoride determination in aqueous samples based on the hydroxyl deprotection reaction of a cyanine dye. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 311-316, 2005.

ZIEROLD, K. M.; KNOBELOCH, L.; ANDERSON, H. Prevalence of chronic diseases in adults exposed to arsenic-contaminated drinking water. **American Journal of Public Health**, v. 94, p. 1936-1937, 2004.

APÊNDICES

Apêndice 1 -Determinação de cloro em amostras de carvão utilizando HR-CS GF MAS e análise direta de sólidos

Spectrochimica Acta Part B 114 (2015) 46–50



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

Determination of chlorine in coal via the SrCl molecule using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis



Éderson R. Pereira^a, Lucas M. Rocha^a, Heloisa R. Cadornim^a, Vanessa D. Silva^a, Bernhard Welz^{a,b,*}, Eduardo Carasek^a, Jailson B. de Andrade^b

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do CNPq, INCT de Energia e Ambiente, Universidade Federal do Bahia, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 July 2015
Accepted 2 October 2015
Available online 9 October 2015

Keywords:
High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry
Graphite furnace vaporization
Direct solid sample analysis
Chlorine determination
Coal analysis

ABSTRACT

In this study, the determination of chlorine in coal is described via molecular absorption of the strontium monochloride (SrCl) molecule at 635.862 nm using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR-CS GF MAS) and direct solid sample analysis. The pyrolysis and vaporization temperatures were optimized and the measurements are accomplished with a platform coated with zirconium as a permanent chemical modifier in order to increase the sensitivity of the gaseous SrCl molecule generated in the graphite furnace. The optimum pyrolysis and vaporization temperatures were 700 °C and 2100 °C, respectively. Under optimized conditions, the limit of detection and characteristic mass of the method were 0.85 and 0.24 ng, respectively. The accuracy of the method has been verified using four certified reference materials and one not certified reference material of coal, and the results were in good agreement with the certified or reference values. © 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coal is known to concentrate many elements and its composition may vary considerably, depending on the geographical region from which it is mined. Coal combustion causes the release of some of these elements into the environment. One of the elements present in coal that gives rise to pollution upon combustion is chlorine. Chlorine compounds in coal can be divided in three forms: chloride ions dissolved in water in the coal matrix, solid inorganic chlorides, and organochlorine compounds in which the chlorine is chemically bound to carbon [1,2]. The content of trace elements in coal is clearly relevant to any environmental aspect during mining, beneficiation, and usage, because much, if not all, of the chlorine present in coal is released to the atmosphere, mostly as HCl. The chlorine content is usually determined to evaluate the HCl emission during coal combustion.

Chlorine can be determined by a variety of classical and instrumental techniques, such as gravimetric or volumetric analysis, energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF), ion chromatography, cold vapor molecular absorption spectrometry, and electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS) [3–6]. However, a suitable sample pretreatment, such as alkaline

fusion [7], pyrohydrolysis [8,9], microwave-induced combustion [10], or oxygen bomb combustion [11] is frequently required when these techniques are employed for the determination of chlorine. Although these procedures were often used, it is well known that they are time consuming and include a high risk of contamination. EDXRF and ETV-ICP-MS do not require sample digestion, but they usually need certified reference materials (CRM) for calibration.

Atomic absorption spectrometry (AAS) using a graphite furnace (GF) atomizer is frequently used for the direct determination of a wide range of trace elements; however, the direct determination of chlorine via AAS is not possible because its resonance lines are in the vacuum ultraviolet region below 190 nm, a spectral range that is not accessible with conventional equipment. However, this obstacle was overcome in the last decade due to the availability of instrumentation for high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry (HR-CS AAS), which uses a xenon short-arc lamp as continuum radiation source, a high-resolution double monochromator, and a charge-coupled device (CCD) array detector. The main features of HR-CS AAS are flexible access to all wavelengths in the range from 180 to 900 nm, high spectral resolution ($\lambda/\Delta\lambda \approx 175,000$), and effective and flexible background correction. These advantages make the equipment also an ideal tool for molecular absorption spectrometry (MAS) [12]. This technique makes possible the determination of non-metals via the electron excitation spectra of diatomic molecules that exhibit a pronounced rotational fine structure. The individual 'lines' of this fine structure have a

* Corresponding author at: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil. Fax: +55-48 3721 0850.
E-mail address: wbermano@terra.com.br (B. Welz).

half-width similar to that of atomic lines [12–16]. Besides chlorine other non-metals, such as fluorine [17–24], bromine [25–28], sulfur [24, 29–34], and phosphorus [24,35,36] have been successfully determined using this technique [12].

In the case of complex samples, such as coal, graphite furnace molecular absorption spectrometry (GF MAS) appears to be a good choice for the determination, because it is one of the most sensitive techniques for trace element determination. In addition, in the case of high analyte concentrations, a great number of less sensitive lines are usually available in the vicinity of the main line in order to reduce the sensitivity of the determination. This technique also makes it possible using the direct analysis of solid samples (SS), which has several advantages, such as: i) high sensitivity, ii) reduced risk of contamination and/or loss of analytes, iii) does not use expensive or hazardous reagents, and iv) the results are obtained more rapidly [37].

A recent review article by Resano et al. [38] cites a few articles investigating the use of HR-CS GF MAS for chlorine determination. Usually only the AlCl molecule [14,24,38] was reported in the literature and the limited number of publications might indicate some problems in the chlorine determination, probably due to interferences. This molecule is in a spectral range, where the risk for an overlap with atomic lines is relatively high and, in addition, the band head of this molecule is relatively broad, which makes background correction more difficult. This broadening was found to be due to an isotopic splitting, because the two molecules, $Al^{27}Cl$ and $Al^{27}Cl$, absorb at slightly different wavelengths [39].

In a recent article, Pereira et al. [40] started to investigate the determination of chlorine in biological reference materials using HR-CS GF MAS of the strontium mono-chloride ($SrCl$) molecule and direct SS analysis, using the strongest absorption line at 635.862 nm. The results show good agreement with the informed and certified values and a limit of detection and characteristic mass of 1.0 and 2.2 ng, respectively.

The goal of this work was to expand the direct solid sample analysis for Cl determination via the $SrCl$ molecule to the analysis of coal samples using HR-CS GF MAS, searching for an alternative and simple method for this purpose. The main parameters, such as pyrolysis and vaporization temperatures, were optimized. Furthermore, a study was carried out to verify the possibility of using aqueous standard solutions for calibration, which dispenses the use of certified reference materials for calibration.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

All the measurements were performed using a high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer Model contraAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) with a transversely heated graphite tube atomizer. The instrument is equipped with a xenon short-arc lamp as continuum source, which emits a continuous spectrum from 185 to 900 nm. The high resolution of the radiation takes place in a double monochromator consisting of a prism monochromator and an echelle grating monochromator, both in Littrow-mounting. The absorption of the $SrCl$ molecule has been measured in the vicinity of the 635.862 nm band head, adding the integrated absorbance of three pixels ($CP \pm 1$).

Pyrolytically coated graphite tubes with a PIN platform (Analytik Jena, Part No. 407-A81.025) were used initially for the optimization of the method with aqueous standard solutions while tubes without platform and without dosing hole (Analytik Jena, Part No. 407-A81.303) were used in all experiments with direct SS analysis. The solid samples were weighed directly onto SS platforms (Analytik Jena Part No. 407-152.023) using an M2P microbalance (Sartorius, Göttingen, Germany). A manual solid sampling system, SSA 6 (Analytik Jena), was used to insert the solid sampling platforms into the SS graphite tube. Aqueous standard and modifier solutions were injected manually onto the

platform using a micropipette. The optimized temperature program used for all determinations with HR-CS GF MAS is shown in Table 1.

2.2. Reagents and reference materials

Ultrapure water with a resistivity of 18 M Ω cm, obtained from a Model Mega ROUP purification system (Equisul, Petrolas, Brazil), has been used throughout for dilution and preparation of the standard solutions. The aqueous standard solution of 5 mg L⁻¹ Cl was prepared by dissolving an appropriate amount of NaCl (Fluka, Buchs, Switzerland) in purified water. The molecule-forming reagent solution containing 10 g L⁻¹ Sr²⁺ was prepared by dissolving an appropriate amount of SrCO₃ (Vetec, Duque de Caxias, Brazil) in 5% (v/v) acetic acid (Vetec). A stock standard solution of 1 g L⁻¹ zirconium (Fluka) was used as permanent chemical modifier. The certified reference materials (CRMs) BCR 180, BCR 181, BCR 182 (Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium), NIST 1630a, and NIST 1632b Trace Elements in Coal (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) were used for method development and validation.

2.3. Procedure

Prior to the measurements, the SS platforms were treated with Zr as a permanent chemical modifier. For this purpose, 40 μ L of the modifier solution was deposited onto the platform, which was inserted into the graphite tube and the previously described temperature program [40] was executed. This process was repeated 10 times, which resulted in a total of 400 μ g of modifier deposited onto the platform. About 0.15 mg coal CRM was weighed directly onto the graphite platform without any additional pretreatment. Then, 10 μ L of the molecule-forming Sr²⁺ solution was pipetted manually onto the coal on the graphite platform, which was inserted into the graphite tube and submitted to the temperature program shown in Table 1. Calibration curves in the range of 2–80 ng Cl have been established using aqueous standard solutions (5 mg L⁻¹ NaCl) injected onto the SS graphite platform pretreated with Zr as permanent chemical modifier together with 10 μ L of the molecule-forming Sr²⁺ solution.

The above procedure has been developed using CRM, which are known for being very homogeneous. In the case of real coal samples, this might not necessarily be the case, requiring that the above procedure has to be slightly modified. The most frequently used measure to deal with less homogeneous samples is to increase the sample mass per analysis until a satisfactory repeatability has been obtained. Other ways of dealing with non-homogeneous samples might be found in the book of Kurfürst [41]. Obviously, a greater sample mass might require a reduction of sensitivity, particularly for samples with higher chlorine content. Fortunately, HR-CS GF MAS is offering a variety of easy measures that can be taken to meet this goal. Firstly, due to the large number of rotational transitions in a molecule, there are always several less sensitive lines available close to the most sensitive line that might be used to reduce sensitivity. Secondly, the number of pixels used for evaluation might be reduced to lower the sensitivity; using the center pixel (CP) only instead of $CP \pm 1$ reduces the sensitivity by at least a factor of two. Thirdly, using a mild Ar gas flow in the vaporization

Table 1
Temperature program used for chlorine determination via the $SrCl$ molecule using HR-CS GF MAS; an argon gas flow-rate of 2.0 L min⁻¹ was used in all stages, except during gas adaptation and vaporization, where the gas flow was interrupted.

Stage	Temperature / °C	Ramp / °C s ⁻¹	Hold / s
Drying 1	110	50	20
Drying 2	120	50	20
Pyrolysis	700	100	10
Gas adaptation	700	0	5
Vaporization	2100	3000	5
Clean	2400	1000	6

stage instead of interrupting the gas flow completely is a measure that was used in GF AAS for decades to reduce sensitivity.

3. Results and discussion

3.1. SrCl molecular absorption spectra

As previously mentioned, there are only a few articles in which the use of HR-CS GF MAS was investigated for chlorine determination, and only the AlCl molecule was reported in the literature for this technique. However, this molecule appears to present some problems due to spectral interferences and the relatively broad band head, which makes background correction difficult. A new approach for the determination of chlorine via HR-CS GF MAS was proposed by our group [40], making a theoretical and experimental study of the absorption spectrum of the SrCl molecule for Cl determination, using biological samples as an example.

The SrCl molecule has a sequence of absorption bands in the visible region of the electromagnetic spectrum in the range from 600 to 660 nm, with a strong absorption line at 635.862 nm. The sequence of absorption lines of the SrCl spectrum provides the possibility of using other absorption lines with lower sensitivity in case the Cl concentration is too high to be determined at the most sensitive line. Furthermore, these bands are located in a wavelength range with a relatively low risk of spectral interference, because only a few atoms and molecules have absorption lines or bands in the visible spectral range. The molecular absorption spectrum of SrCl shown in Fig. 1 was generated from about 0.10 mg of coal BCR 180 (about 60 ng Cl) and 0.1 mg Sr ($10 \mu\text{L}$ of $10 \text{ g L}^{-1} \text{ Sr}^{2+}$ solution). It shows complete absence of any other atomic or molecular absorption line or band that could interfere with the determination. This means, there is no risk for any spectral interference.

3.2. Optimization of the graphite furnace program for direct solid sample analysis

It is well documented that there is a need to optimize some parameters, such as the chemical modifiers and the graphite furnace program, for each application in GF AAS. The same is obviously true for GF MAS, because, when these parameters are optimized, they tend to increase the formation and stability of the target molecule and thus the sensitivity of the method [13]. We published a detailed paper [40] showing the formation and stability of the SrCl molecule when vaporized in the

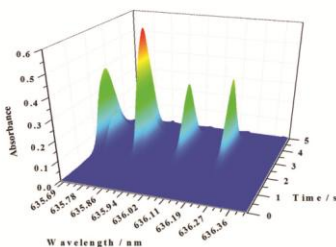


Fig. 1. Time-resolved absorbance spectrum for about 0.10 mg of BCR 180 coal CRM (ca. 60 ng Cl) in the vicinity of the absorption line at 635.862 nm of the SrCl molecule; 0.1 mg Sr^{2+} ($10 \mu\text{L}$ of $10 \text{ g L}^{-1} \text{ Sr}^{2+}$ solution) as the molecule-forming reagent and Zr as permanent modifier.

presence of different permanent chemical modifiers, such as Zr or Pd, and observed that Zr was the best one. Hence, the same permanent chemical modifier was used for coating of the SS platform for the determination of Cl in coal. The pyrolysis and vaporization temperatures were optimized using an aqueous standard solution of 50 ng Cl and $\approx 0.10 \text{ mg}$ of coal sample BCR 180. The results are shown in Fig. 2A and B.

For the aqueous standard solutions, the pyrolysis temperature did not play an important role and gave essentially the same integrated absorbance signal up to a pyrolysis temperature of $1400 \text{ }^\circ\text{C}$. For the solid coal sample, in contrast, the pyrolysis temperature was very critical; the highest signal was obtained when a temperature of $700 \text{ }^\circ\text{C}$ was used. At lower temperatures no analytical signal could be obtained in the vaporization stage due to the great amount of smoke in the optical path; when temperatures higher than $700 \text{ }^\circ\text{C}$ were used, the analytical signal decreased significantly. A similar behavior was found for the determination of Cl in biological samples [40], showing that the chlorine compounds present in coal and in biological samples have a thermal behavior different from that of the aqueous solutions. A pyrolysis temperature of $700 \text{ }^\circ\text{C}$ has therefore been chosen for all future investigations.

For the aqueous standard solution, a vaporization temperature of $2000\text{--}2200 \text{ }^\circ\text{C}$ could be used with essentially no difference in the integrated absorbance for the analyte (Fig. 2B). For the solid coal sample, however, the choice of the vaporization temperature was more critical. Although the highest integrated absorbance values were obtained with vaporization temperatures of $1900\text{--}2000 \text{ }^\circ\text{C}$, the analytical signal was totally deformed and with poor repeatability. The same behavior was found in earlier work for biological materials using the same technique [40]. The optimum vaporization temperature using direct SS analysis and the Zr permanent modifier is $2100 \text{ }^\circ\text{C}$, which was used in all following experiments.

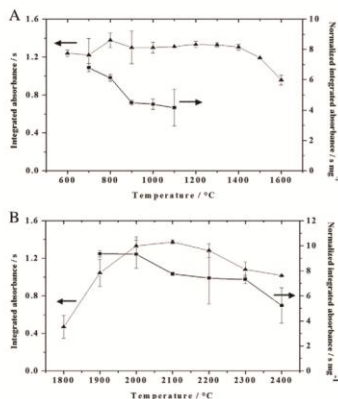


Fig. 2. (A) Pyrolysis and (B) vaporization curves for (▲) aqueous standard solution of 50 ng Cl ($10 \mu\text{L}$ of 5 mg L^{-1} solution), and (■) about 0.08 mg of BCR 180, normalized for a content of 50 ng Cl, all in the presence of 0.10 mg Sr^{2+} ($10 \mu\text{L}$ of $10 \text{ g L}^{-1} \text{ Sr}^{2+}$ solution) with Zr as the permanent modifier. For T_{py} optimization, the T_{vap} was $2300 \text{ }^\circ\text{C}$ while for T_{vap} optimization, the T_{py} was $700 \text{ }^\circ\text{C}$. Each point represents the mean of three measurements; the error bars are plus minus 1 standard deviation.

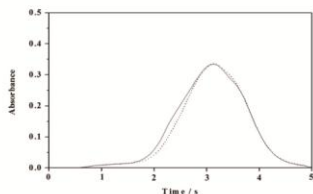


Fig. 3. Comparison of the time-resolved absorbance of the SrCl molecule, obtained for the vaporization of 60 ng Cl using about 0.10 mg of BCR 180 (solid line) and 60 ng Cl obtained using 12 µL of 5 mg L⁻¹ Cl solution (dotted line). Zr as the permanent modifier; 0.10 mg Sr (10 µL 1% m/v Sr²⁺ solution); T_{vap} of 2100 °C; and T_{DTF} of 700 °C.

The next step was to make sure that the analytical signal of the solid sample was similar to that of an aqueous standard solution using the optimized temperature program. Therefore, the analytical signal obtained from 60 ng Cl in a solid coal sample (about 0.10 mg of BCR 180) was superimposed to the signal from 60 ng Cl obtained using a solution of 5 mg L⁻¹ Cl. The concordance (95% confidence level) between the results from two significantly different sample types (aqueous standard solution and solid coal sample) is shown in Fig. 3. As also the pyrolysis and vaporization temperatures for the solid sample and the aqueous standard solution were very similar, there appeared to be no necessity to carry out the calibration with solid coal CRM, rendering the process faster, simpler, and cheaper.

The fact that the same permanent chemical modifier, a very similar temperature program, and aqueous standard solutions could be used for calibration in this work for the determination of Cl in coal and in our previous work for biological materials [40] might be considered an indication for the robustness of the developed method and of HR-CS SS-GF MAS in general. Nevertheless, a certain 'fine-tuning' of these parameters for each new matrix is indispensable to obtain optimum results.

3.3. Calibration curve and analytical characteristics of the method

The calibration curve was established with aqueous standard solutions in the mass range of 2–80 ng Cl. The different figures of merit found in this work are summarized in Table 2. Good linearity with a correlation coefficient (R) of 0.996 was obtained and the relative standard deviation (RSD) for each equidistant point in the calibration curve was between 0.7% and 12%.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were 0.8 ng and 2.8 ng or 5.6 µg g⁻¹ and 18.6 µg g⁻¹, respectively, considering a mass of 0.15 mg of sample; LOD and LOQ were calculated as 3 and 10 σ/S (n = 10), where σ is the standard deviation of 10 blank measurements and S is the slope of the calibration

Table 2
Analytical figures of merit for the determination of Cl via the SrCl molecule using HR-CS GF MAS and calibration with aqueous standard solutions.

Figure	Found value
Limit of detection / ng	0.8
Limit of quantification / ng	2
Linear range / ng	2–80
Slope of calibration / ng ⁻¹ s ⁻¹	0.018
R	0.996
m ₀ /ng	0.2
RSD/% ^a	0.7–12

^a RSD for each point in the calibration curve.

Table 3

Results for chlorine determination via SrCl molecular absorption using HR-CS GF MAS in different coal CRM and RM. All values are in g kg⁻¹; they represent the mean of five measurements ± standard deviation (SD). Also shown are the values obtained by SS-ETV-ICP-MS from Ref. [6].

CRM	Found	SS-ETV-ICP-MS ^a	Certified
BCR 180	0.54 ± 0.08	0.57 ± 0.06	0.59 ± 0.03
BCR 181	1.25 ± 0.17	n.d.	1.38 ± 0.05
BCR 182	3.06 ± 0.36	n.d.	3.70 ± 0.07
NIST 1632b	1.41 ± 0.29	1.19 ± 0.09	1.20 ^b
NIST 1633a	1.18 ± 0.14	1.10 ± 0.09	1.14 ± 0.03

n.d., Not determined.

^a Values from Ref. [6].

^b Informed value.

(S = 0.018 ng⁻¹ s⁻¹). The characteristic mass (m₀) was 0.2 ng, which was calculated as the concentration of Cl corresponding to an integrated absorbance of 0.0044 s, i.e. 0.0044/slope of calibration curve.

The LOD found in this work is better than the LOD found in earlier work [40] using the same molecule and Zr as permanent chemical modifier. However, this was expected since in previous work we used a higher temperature (2300 °C), which was the compromise temperature for solid biological samples and aqueous solutions. Here, we used the optimum temperature of vaporizations which was similar for both forms of sample introduction (2100 °C), with increased sensitivity. In the same way, the LOD found here is better than that found by Frecheira et al. [14], where the AlCl molecule was used for the determination of Cl in food samples using two different digestion methods, namely, an acid digestion method using HNO₃ only at room temperature, and a digestion method with Ag, HNO₃, and H₂O₂, where chlorine was precipitated as low-soluble AgCl, which was then dissolved with ammonia solution, where the LOD using the two procedures were 2.4 and 1.2 ng, respectively. It is also worth mentioning that the LOD found using the SrCl molecule is comparable or better than that using ICP-MS for the determination of Cl in coal samples [6,10].

3.4. Determination of chlorine in coal CRM

The present method was applied for four coal CRM and one RM. The results obtained for the determination of chlorine by HR-CS GF MAS via the SrCl molecule and direct SS analysis are summarized in Table 3.

The results show that the values found using the developed method for the determination of Cl via HR-CS SS-GF MAS were not significantly different from the certified or indicative values, based on a Student's t-test (p > 0.05). There is also a good agreement between the results found in this work and those published by Gois et al. [6], who used ETV-ICP-MS.

4. Conclusions

A simple and fast method was developed for the determination of chlorine via the SrCl molecule generated in a graphite furnace and determined by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry using direct solid sample analysis. Zirconium and Sr²⁺ were successfully employed as permanent chemical modifier and molecule-forming reagent, respectively. The calibration curves were established using aqueous standard solutions, eliminating the use of certified reference materials for calibration, which is of great analytical interest. For all CRM and RM available, the method showed good agreement with the certified and reference values. It might be expected that the same procedure could be used with minor modifications for the determination of chlorine in other matrices.

Acknowledgment

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and research scholarships. The authors are also grateful to Analytik Jena AG for continued financial support.

References

- [1] D.J. Swaine, Chapter 2 - Origin of trace elements in coal, in: D.J. Swaine (Ed.), *Trace Elements in Coal*, Butterworth-Heinemann 1990, pp. 8–26.
- [2] A. McCulloch, M.L. Auscott, C.M. Benkovic, T.E. Graedel, G. Kleinman, P.M. Midgley, V. U. Global emissions of hydrogen chloride and chloromethane from coal combustion, incineration and industrial activities: reactive chlorine emissions inventory, *J. Geophys. Res.* 104 (1999) 8391–8403.
- [3] A. Dreyke, A. Saavedra, M.L.R. Trisaldi, M. Nele, R.Q. Azeiteiro, Direct chlorine determination in crude oils by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry: an improved method based on a proper strategy for sample homogenization and calibration with inorganic standards, *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 368–372.
- [4] P. Parvinen, Determination of chloride in inorganic solid samples by cold vapour molecular absorption spectrometry as Cu_2Cl_2 , *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 279–284.
- [5] E.L.C. Silveira, L.R. de Caland, M. Tubino, Simultaneous quantitative analysis of the acetate, formate, chloride, phosphate and sulfate anions in biodiesel by ion chromatography, *Fuel* 124 (2014) 97–101.
- [6] J.S. de Góis, É.R. Pereira, B. Welz, D.L.G. Borges, Simultaneous determination of bromine and chlorine in coal using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and direct solid sample analysis, *Anal. Chim. Acta* 852 (2014) 82–87.
- [7] J.A. Nóbrega, M.C. Santos, R.A. de Sousa, S. Cadore, R.M. Barnes, M. Tatro, Sample preparation in alkaline media, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2006) 465–465.
- [8] F.A. Duarte, É.R. Pereira, Determinação espectrofotométrica de cloreto em cimento após preparo de amostra por pirrodioxido, *Quim. Nova* 36 (2013) 716–719.
- [9] B. Peng, D. Wu, J. Lai, H. Xiao, P.L. Simultaneous determination of halogens (F, Cl, Br, and I) in coal using pyrohydrolysis combined with ion chromatography, *Fuel* 94 (2012) 629–631.
- [10] E.M.M. Flores, M.F. Mesizo, D.P. Moraes, J.S.F. Pereira, P.A. Mello, J.S. Barin, G. Knapp, Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique, *Anal. Chim. Acta* 80 (2006) 1865–1870.
- [11] Y.S. Fung, K.L. Dai, Oxygen bomb combustion ion chromatography for elemental analysis of heteroatoms in fuel and wastes development, *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 347–355.
- [12] B. Welz, F.G. Lepré, R.G.O. Araujo, S.L.C. Ferreira, M.-D. Huang, M. Okrusch, H. Becker-Ross, Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces—a review, *Anal. Chim. Acta* 647 (2009) 137–148.
- [13] D.J. Butcher, Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: a review, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 1–15.
- [14] M. Fechetia, A.L. Tognoni, M.A.M.S. da Veiga, Determination of chlorine in food samples via the ACl_2 molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, *Spectrochim. Acta Part B* 71–72 (2012) 98–101.
- [15] B. Welz, M.G.R. Vale, É.R. Pereira, I.N.B. Castillo, M.B. Dessay, Continuum source atomic absorption spectrometry: past, present and future aspects—a critical review, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 799–821.
- [16] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M.D. Huang, M. Okrusch, B. Radziuk, Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: a historical perspective, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2006) 1015–1030.
- [17] P.M. Machado, S. Morés, É.R. Pereira, B. Welz, E. Carasek, J.B. de Andrade, Fluorine determination in coal using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, *Spectrochim. Acta Part B* 105 (2015) 18–24.
- [18] S. Morés, G.C. Monteiro, F.d.S. Santos, E. Carasek, B. Welz, Determination of fluorine in tea using high-resolution molecular absorption spectrometry with electrothermal vaporization of the calcium mono-fluoride CaF_2 , *Talanta* 85 (2011) 2681–2685.
- [19] H. Gleisner, B. Welz, J.W. Eitner, Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer, *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 864–869.
- [20] N. Ozbek, S. Akman, Method development for the determination of fluorine in water samples via the molecular absorption of strontium monofluoride formed in an electrothermal atomizer, *Spectrochim. Acta Part B* 69 (2012) 32–37.
- [21] N. Ozbek, S. Akman, Determination of fluorine in milk samples via calcium monofluoride by electrothermal molecular absorption spectrometry, *Food Chem.* 138 (2013) 650–654.
- [22] M. Krüger, M.-D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, I. Ott, R. Gust, Quantification of the fluorine containing drug 5-fluorouracil in cancer cells by CaF_2 molecular absorption via high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 69 (2012) 50–55.
- [23] H. Gleisner, J.W. Eitner, S. Morés, B. Welz, E. Carasek, A fast and accurate method for the determination of total and soluble fluorine in toothpaste using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and its comparison with established techniques, *J. Pharm. Biomed. Sci.* 54 (2011) 1040–1046.
- [24] U. Heitmann, H. Becker-Ross, S. Florek, M.D. Huang, M. Okrusch, Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source spectrometry and graphite furnace atomization, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 21 (2006) 1314.
- [25] T. Limburg, J.W. Eitner, Determination of bromine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, *Microchem. J.* 107 (2013) 31–36.
- [26] É.R. Pereira, I.N.B. Castillo, B. Welz, J.S. Góis, D.L.G. Borges, E. Carasek, J.B. de Andrade, Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, *Spectrochim. Acta Part B* 96 (2014) 33–39.
- [27] M.R. Florez, M. Resano, Direct determination of bromine in plastic materials by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32–39.
- [28] M.D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okrusch, High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr₃ and CaBr₂ for the determination of bromine, *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 566–570.
- [29] S. Gunduz, S. Akman, Sulfur determination in some nuts and dried fruits sold in Turkey by high resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry, *Fuel Sci. Technol.* 59 (2014) 718–723.
- [30] R. Miró, S. Morés, B. Welz, E. Carasek, J.B. de Andrade, Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace, *Talanta* 106 (2013) 368–374.
- [31] A. Baysal, S. Akman, A practical method for the determination of sulphur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry, *Talanta* 85 (2011) 2662–2665.
- [32] Z. Kowalewska, Feasibility of high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in flame and furnace for sulphur determination in petroleum products, *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 546–556.
- [33] C. Baumback, T. Limburg, J.W. Eitner, Quantitative determination of sulfur by high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry, *Microchem. J.* 106 (2013) 295–299.
- [34] F.V. Nakadi, L.R. Rosa, M.A.M.S. da Veiga, Determination of sulfur in coal and ash slurry by high-resolution continuum source electrothermal molecular absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 80–84.
- [35] M.A. Bechlin, J.A. Gomes Neto, J.A. Nóbrega, Evaluation of lines of baron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis, *Microchem. J.* 109 (2013) 134–138.
- [36] F.G. Lepré, M.B. Dessay, M.G.R. Vale, D.L.G. Borges, B. Welz, U. Heitmann, Investigation of chemical modifiers for phosphorus in a graphite furnace using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2006) 934–944.
- [37] B. Welz, M.G.R. Vale, D.L.G. Borges, U. Heitmann, Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 2085–2095.
- [38] M. Resano, M.R. Florez, E. Garcia-Ruiz, Progress in the determination of metalloids and non-metals by means of high-resolution continuum source atomic or molecular absorption spectrometry. A critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2259–2259.
- [39] F.V. Nakadi, M.A.M.S. da Veiga, E. Garcia-Ruiz, M. Resano, Chlorine isotope determination via the monitoring of the ACl_2 molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry—a case study, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1531–1540.
- [40] É.R. Pereira, B. Welz, A.H.D. Lopez, J.S. de Góis, G.F. Caramori, D.L.G. Borges, E. Carasek, J.B. de Andrade, Strontium monochloride—a new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, *Spectrochim. Acta Part B* 102 (2014) 1–6.
- [41] U. Kurfürst (Ed.), *Solid Sample Analysis*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1988.

Apêndice 2 - Determinação de cloro em amostras de óleo de peixe utilizando HR-CS GF MAS

Food Control 78 (2017) 456–462



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Development of a fast screening method for the direct determination of chlorinated persistent organic pollutants in fish oil by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry



Éderson R. Pereira^a, Josias Merib^a, Heloisa R. Cadorim^a, Mauana Schneider^a, Gabriel S. Carvalho^b, Fabio A. Duarte^b, Bernhard Welz^{a,c,*}, Javier del Campo Menoyo^d, Joerg Feldmann^e

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do CNPq – INCT de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, Campus Ondina, Salvador, BA, Brazil

^d Golden Omega S.A., Av. Comandante San Martín 3460, Lote B-2, Arica, Chile

^e Trace Element Speciation Laboratory (TESLA), Department of Chemistry, University of Aberdeen, Scotland, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2017

Received in revised form

12 March 2017

Accepted 13 March 2017

Keywords:

Persistent organic pollutants

Organochlorines

Total chlorine determination

Fish oil

Omega-3 supplements

High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry

ABSTRACT

The occurrence of persistent organic pollutants (POPs), mainly organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls, was directly associated with several diseases and environmental endocrine disrupting. In the aquatic environment, POPs can accumulate in fish lipid tissues due to their high hydrophobicity, and become this way one of the main sources of human exposure to POPs through the consumption of fish meat and oil as Omega-3 source. Chlorine might serve as a proxy for the presence of POPs, and a fast screening of chlorine in a complex matrix, such as fish oil, could provide substantial information about the contamination with POPs. Therefore, a method has been developed in this work for the determination of total chlorine in fish oil samples via molecular absorption of the strontium mono-chloride molecule in the gas phase using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. The effect of zirconium as permanent chemical modifier in the pyrolysis and vaporization stages was optimized in order to avoid the need for any kind of sample preparation prior to the determination of total chlorine, using just a dilution with 1-propanol. The accuracy has been evaluated using micro-coulometric titration after sample combustion, and the values were statistically in agreement (95% confidence level) between both techniques. The method has been applied for the determination of total chlorine in five different fractions of a commercial pooled marine fish oil sample collected from the Pacific Ocean, where the majority of the fish is Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*), two commercial oils from Brazil and three Omega-3 supplements acquired in Germany. The limit of detection of the procedure is 1.8 ng Cl absolute or 0.9 µg g⁻¹ Cl in the fish oil. The time required for a single determination is less than 5 min, and less than 15 min for a triplicate determination.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chlorine has a huge importance in human health and may be present in several matrices with very different degrees of

complexity. Some of the chlorine compounds, known as "organochlorines", are a class of the "Persistent Organic Pollutants" (POPs) and have properties of accumulation in lipid-rich tissues and sediments (Merib, Nardini, & Carasek, 2014). Therefore, the bioaccumulation of chlorine in fish tissues in aquatic systems emerges as a possible contamination, once fish is an important component of the diet of many people around the world. In addition, the oil obtained from fish is a source of energy and calories, a mixture of colorants, steroids, glycols, phospholipids and fatty acids, where

* Corresponding author. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.
E-mail address: w.bernardo@terra.com.br (B. Welz).

polyunsaturated Omega-3 fatty acids can be found, predominantly with four to six double bonds (Pereira et al., 2016).

During the industrial processes leading to the purification of the raw fish oil and concentration of the Omega-3 fatty acids, the concentration of the organochlorine compounds is lowered to meet regulatory specifications, relying on chromatographic methods for the individual quantification of compounds or classes of compounds in the final product. However, the level of complexity and cost required for such determinations, including sample preparation steps, precludes their application in the quality control of an industrial laboratory. Considering that most of the regulated POPs contain chlorine in their molecules, the determination of total chlorine in the oil with little or no sample preparation can be envisaged as an excellent tool in a manufacturing environment.

Usual monitoring methods are gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) and to a lesser extent high performance liquid chromatography electron spray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). Both techniques are molecular-specific and are useful if detailed information about the nature of the chlorinated compounds is needed. However, they are often used for target analysis and not giving the total sum of all chlorinated compounds since they are hidden amongst hundreds of other organic compounds, which are in much higher concentrations. Additionally, due to the use of chromatographic separation the sample throughput is not high, leaving alone the need for sample preparation steps.

A variety of methods was proposed to determine chlorine in different matrices, including classical procedures, such as gravimetric or volumetric analysis, ion-chromatography and ion-selective electrode potentiometry (Flores et al., 2008; Mello et al., 2013; Peng, Wu, Lai, Xiao, & Li, 2012; Smith, McMurtrie, & Galbraith, 1977). However, these techniques often require a sample digestion prior to analyte determination, including Schöniger oxidation (Flores, Barin, Mesko, & Knapp, 2007), alkaline fusion (Blackwell, Cave, Davis, & Malik, 1997), pyrohydrolysis (Duarte et al., 2013) or microwave-induced combustion (Flores et al., 2007, 2008). Plasma-based techniques, such as inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and mass spectrometry (ICP-MS) are not usually employed for the determination of chlorine. In the case of ICP-OES, the wavelengths of this element are situated in the vacuum-UV (<200 nm), making it difficult to separate the analytical signal from the noise, unless a purged monochromator is used (Welz et al., 2009). On the other hand, the ionization is also very low due to the high ionization potential of Cl (12 eV) in an argon-based plasma.

Eliminating sample preparation as much as possible from the analytical protocol avoids or at least reduces the risk of contamination and analyte losses, is less time consuming, and often improves the limit of detection. However, only a few analytical techniques have shown some capacity for the determination of chlorine with relative sensitivity and accuracy, mainly for complex matrices, using direct determination. Among these techniques are electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS) (Antes et al., 2013; Gois, Pereira, Welz, & Borges, 2014; Gois, Pereira, Welz, & Borges, 2015), laser induced plasma spectrometry (LIPS) (Kaski, Häkkinen, & Korppi-Tommola, 2004), X-ray fluorescence spectrometry (XRF) (Doyle, Saavedra, Tristão, Nele, & Aucelio, 2011), and more recently also high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR-CS GF MAS) (Bechlin, Ferreira, & Gomes Neto, 2017; Enders et al., 2016; Guarda et al., 2017; Heitmann, Becker-Ross, Florek, Huang, & Okruss, 2006; Nakadi, da Veiga, Aramendia, Garcia-Ruiz, & Resano, 2015; Ozbek & Akman, 2016; Pereira et al., 2014, 2015; Welz, Vale, Pereira, Castilho, & Dessuy, 2014). The last technique is a very robust tool with a high tolerance

for complex matrices due to the use of a graphite tube furnace, which makes possible the analysis of liquids, slurries and solid samples. It often permits to skip sample preparation, making this technique an interesting alternative for the determination of chlorine.

For MAS, bands of diatomic molecules that exhibit a pronounced rotational fine structure can be formed in the graphite tube vaporizer employing a molecule-forming reagent and can be monitored for quantitative determination (Welz et al., 2009). The successful application of HR-CS GF MAS is correlated with the continuum radiation source coupled to a high-resolution double monochromator and a linear charge-coupled device (CCD) array detector providing a resolution of $\lambda/\Delta\lambda \approx 175,000$, which makes possible the use of the entire spectral region (190–900 nm) for analytical measurement at high resolution (Welz, 2004; Welz et al., 2014). The diatomic molecules formed in the gas phase should have dissociation energies higher than 400 kJ mol^{-1} to ensure their stability at the temperatures of the pyrolysis and vaporization stages, and avoid formation of competitive molecules (Butcher, 2013).

The goal of this work was to develop a fast and simple procedure for the direct determination of chlorine in fish oil samples via the SrCl molecule using HR-CS GF MAS, so that a screening for all organochlorine compounds in a fish oil sample becomes feasible. The method describes the use of strontium carbonate solution as the molecule-forming reagent and Zr as permanent chemical modifier, investigating different parameters, such as pyrolysis and vaporization temperatures in relation to matrix components that could interfere directly with the stability of the molecule.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

All measurements have been made using a high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer Model contraA 600 (Analytik Jena AG, Jena, Germany). It is equipped with a transversely heated graphite tube atomizer and a xenon short-arc lamp as the radiation source, with emits a spectral continuum between 190 and 900 nm. The spectrometer consists of a high-resolution double monochromator, equipped with a prism premonochromator for pre-dispersion of the radiation and an echelle grating monochromator for the high resolution. The analytical signal is detected using a CCD array detector with 588 pixels, 200 of which are used for analytical purposes, displaying the vicinity of the analytical line at high resolution (ca. 1.5 p.m./pixel at 200 nm).

Chlorine has been determined via the molecular absorption of SrCl (Pereira et al., 2014), which has been measured at 635.862 nm (Fig. 1) using the integrated absorbance of three pixels (peak volume selected absorbance, PVSA, $A_{2,3,4}$) (Heitmann, Welz, Borges, & Lepri, 2007). All measurements were carried out using pyrolytically coated graphite tubes with PIN platform (Analytik Jena Part No. 407-A81.025) and a sample volume of 20 μl injected with a micro-pipette. Argon 99.996% (Air Liquid, Florianópolis, Brazil) was used as a purge and protective gas. The optimized temperature program used for all determinations with HR-CS GF MAS, is shown in Table 1.

Chlorine was also determined by micro-coulometric titration after sample combustion in a Cl analyser (Model Multi EA[®] 5000 elemental analyser, Analytik Jena), using Ag/AgCl and Pt electrodes. Fish oil samples were weighed and introduced directly into the combustion tube by a solid sample introduction system (Model Multi-matrix sampler MMS 5000, Analytik Jena), using a quartz boat (40 × 9 mm, Part No. 402–889.674, Analytik Jena). The operational conditions of the Cl analyser were used as recommended by the manufacturer: furnace temperature: 1050 °C, time for second

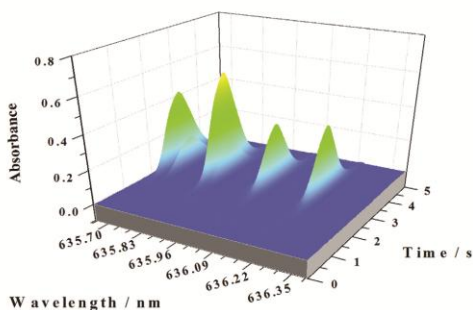


Fig. 1. Time-resolved absorbance spectrum of the SrCl molecule in the vicinity of the most sensitive line at 635.862 nm obtained from 10 μL of a solution (0.4 g of raw fish oil diluted to 2 mL with 1-propanol) pipetted onto the Zr-treated PIN-platform in the graphite tube and 10 μL of a 1% (m/v) Sr^{2+} solution (0.10 mg Sr^{2+}) as molecule-forming reagent.

Table 1

Temperature program used for the determination of Cl via the SrCl molecule in fish oil samples using HR-CS GF MAS; an argon gas flow-rate of 2.0 L min^{-1} was used in all stages, except in the vaporization stage, where it was turned off.

Stage	Temperature/°C	Ramp/°C s ⁻¹	Hold time/s
Drying 1	110	10	25
Drying 2	120	10	20
Pyrolysis	1300	50	15
Vaporization	2100	3000	5
Cleaning	2400	1000	4

combustion: 90 s, oxygen flow rate: 100 mL min^{-1} and argon flow rate: 100 mL min^{-1} . Results were measured in peak area with 20 min integration time.

2.2. Reagents and materials

All reagents used for this purpose presented at least analytical grade of purity. Ultrapure water (resistivity 18 $\text{M}\Omega\text{ cm}$) was obtained from a model Mega ROUP purification system (Equisul, Pelotas, Brazil) and was used for preparation of the standard solutions of 1000 mg L^{-1} Cl prepared by dissolving appropriate amounts of NaCl (Fluka, Buchs, Switzerland). A stock solution of 10 g L^{-1} Sr^{2+} was prepared by dissolving appropriate amounts of SrCO_3 (Vetec, Duque de Caxias, Brazil) and was used as the molecule-forming reagent. The solution of 1 g L^{-1} Zr (Fluka) was used as permanent chemical modifier. All bottles were decontaminated with 10% v/v nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) for 24 h and then rinsed with ultrapure water three times before use.

2.3. Procedure

2.3.1. Direct HR-CS GF MAS determination

When HR-CS GF MAS was used, zirconium was initially deposited on the PIN-platform in the graphite tube using ten aliquots of 40 μL of the 1 g L^{-1} Zr solution, each injection followed by a five-step temperature program with previously optimized ramp and hold times after each injection, resulting in a platform coated with 400 μg Zr (Pereira et al., 2014). Subsequently, about 0.4 g of fish oil were

diluted to 2 mL with 1-propanol and 20 μL of this diluted sample were pipetted onto the Zr-treated PIN-platform in the graphite tube and the formation of the SrCl molecule in the vaporization stage was stimulated by adding 10 μL of a 1% (m/v) Sr^{2+} solution and the absorbance measured as described in Section 2.1.

2.3.2. Micro-coulometric procedure

For micro-coulometric titration after sample combustion, a sample mass between 15 and 111 mg was directly weighed on a quartz boat and introduced into the combustion tube using the solid sampling device of the equipment. After sample combustion, the reaction products were transferred through the gas transfer line to the micro-coulometric titration system for Cl determination. The instrument was calibrated by injection of Cl standards using an automatic syringe, an accessory available for the instrument. The calibration range was from 0.8 to 4.0 $\mu\text{g Cl}$ (chlorobenzene diluted in toluene), with R^2 better than 0.999. The accuracy of the method was evaluated using the certified reference material BCR 181 (coking coal), with a certified concentration of $1.38 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$, and a concordance better than 95% (Student's t-test) has been obtained.

2.3.3. Liquid-liquid extraction

In order to eliminate the possibility that chloride or other polar chlorinated compounds are in the lipophilic samples as micelles and increase the measured value for POPs erroneously, a liquid/liquid extraction was performed using ultrapure water and oil sample. Approximately 0.5 g of fish oil was extracted using 0.5 mL ultrapure water, shaken for 1 min and centrifuged at 3000 r.p.m for 10 min. The aqueous extract was separated and 20 μL of this extract was injected onto the graphite platform for the determination of chlorine using HR-CS GF MAS. The analytical signal obtained for the aqueous extract was compared with the blank solution, using just the tube with the Zr coated platform and 10 μL of the 1% (m/v) Sr^{2+} solution for molecule formation.

2.4. Fish oil samples

The crude oil was extracted from fish from the Pacific Ocean, the majority of which being Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) and

Chilean mackerel (*Trachurus murphyi*). The samples were kept in polyethylene flasks at room temperature until they were analyzed. The samples were named as follows: Raw fish oil; Bandalado fish oil; Crude fish oil; Waste fraction (dilute omega-3); Intermediate product. These samples correspond to different stages of the purification process, according to the extraction and purification of marine fish oil by Golden Omega S.A. (Arica, Chile). Other samples named here as sample A and sample B were acquired at a local supermarket in Florianópolis, SC, Brazil and are classified as brute oil (no clean-up stages applied). Additionally three commercial oils 1–3 were acquired at a drugstore in Jena, Germany, and have been classified as pure oil containing polyunsaturated Omega-3 fatty acids and were used as samples.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of pyrolysis and vaporization temperatures

Chlorine was determined successfully in several different samples using direct analysis via the absorption of the SrCl molecule at 635.862 nm in the gas phase of a graphite tube furnace when vaporization temperatures between 1800 °C and 2400 °C were used. The first method employing aqueous strontium as molecule-forming reagent (10 μ L of 1% (m/v) Sr²⁺ solution; 0.10 mg Sr²⁺), for the determination of chlorine was described by Pereira et al. (Pereira et al., 2014). It was applied for the direct determination of total chlorine in biological samples using Zr as permanent chemical

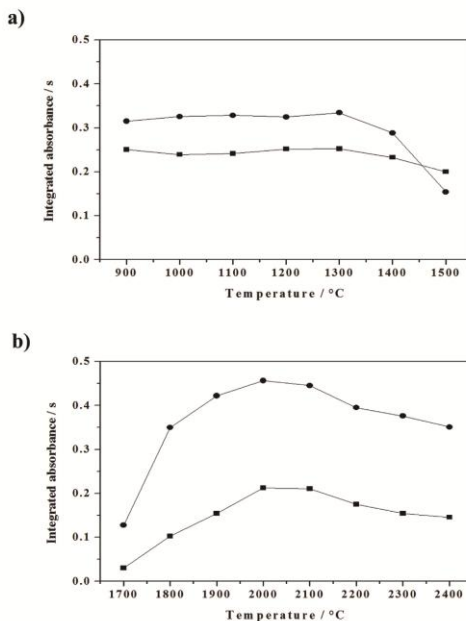


Fig. 2. (a) Pyrolysis and (b) vaporization curves for the SrCl molecule using (●) 10 μ L of 0.2 g mL⁻¹ of raw fish oil diluted in 1-propanol, and (■) 15 μ L of aqueous standard solution of 1 mg L⁻¹ Cl (15 ng Cl absolute). Vaporization temperature for the pyrolysis curve (a) has been 2200 °C; pyrolysis temperature for the atomization curve (b) has been 1300 °C; zirconium as permanent chemical modifier; 10 μ L of 1% (m/v) Sr²⁺ solution (0.10 mg Sr²⁺) as molecule-forming reagent.

modifier and a PIN-platform tube. Later studies have adapted successfully this methodology for the direct determination of chlorine in coal (Pereira et al., 2015), crude oil (Enders et al., 2016) and milk (Ozbek & Akman, 2016), also using direct analysis. This demonstrates the wide application field for this methodology, highlighting also the robustness of the direct analysis approach compared to other methods that use more elaborate sample preparation. The crucial parameters for this present work, such as permanent modifier (zirconium), graphite tube with PIN-platform, and a strontium mass of 0.10 mg were therefore fixed according to previous optimization (Pereira et al., 2014, 2015), and the pyrolysis and vaporization temperatures were established comparing the integrated absorbance and the analytical signal of chlorine in fish oil and in an aqueous standard solution.

The pyrolysis curves for chlorine in an aqueous solution containing 15 ng Cl and in 10 μ L of raw fish oil are shown in Fig. 2(a). The analytical signal remains constant for temperatures between 900 °C and about 1300 °C for chlorine in fish oil and in aqueous solution. Temperatures lower than 900 °C were not considered due to the very noisy analytical signal in the case of the fish oil sample, due to the dense smoke caused by the residual lipid matrix in the tube at these temperatures. The pyrolysis curve found in this work for an aqueous chlorine standard solution was consistent with that found in earlier work (Pereira et al., 2014, 2015), with pyrolysis temperatures of up to 1300 °C without loss of sensitivity. As the same high temperature can be used for the fish oil samples, it can be made sure that essentially the entire matrix can be eliminated. The similarity between the behavior of Cl from fish oil and an aqueous standard solution makes possible using 1300 °C as optimal pyrolysis temperature.

The vaporization curves for Cl (as SrCl) in the aqueous standard solution and in the fish oil sample are shown in Fig. 2(b) for the temperature range 1700 °C–2400 °C. The maximum molecular absorbance signal was obtained for the aqueous standard solution and for the fish oil when temperatures of 2000 °C and 2100 °C were used. The results for the aqueous standard agreed with those found in earlier work (Pereira et al., 2014), where a similar profile was obtained using Zr as a permanent chemical modifier and a graphite tube with integrated PIN-platform. A vaporization temperature of 2100 °C was chosen for all future work.

3.2. Calibration and figures of merit

The figures of merit, such as calibration range, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) using aqueous standard solutions for calibration were evaluated and are shown in Table 2. The LOD and LOQ were calculated as three and ten times the standard

Table 2
Figures of merit for the determination of Cl in fish oil samples by HR-CS GF MAS.

Parameter	Chlorine
Absorption wavelength ^a , nm	635.862
Limit of detection ^b , ng	1.8
Limit of detection ^c , μ g g ⁻¹	0.9
Limit of quantification ^d , μ g g ⁻¹	3.0
Characteristic mass m ₀ ^e , ng	0.32
Correlation coefficient, R ²	0.998
Linear working range, ng	3–80
Slope of calibration S, s ng ⁻¹	0.0136

^a Integrated absorbance using three pixels (CPx1).

^b Calculated as 3 σ /S (n = 10).

^c Considering 0.4 g of sample diluted to 2 mL using 1-propanol.

^d Calculated as 10 σ /S (n = 10), considering 0.4 g of sample diluted to 2 mL using 1-propanol.

^e Calculated as 0.0044 s/S.

deviation of 10 blank measurements (10 μ L of 1% m/v Sr²⁺ solution; 0.10 mg Sr²⁺) divided by the slope of the calibration curve, 3 and 10 σ /S, considering 0.4 g of sample diluted to 2 mL using 1-propanol. The characteristic mass (m₀) was calculated as $A_{\text{int}} = 0.0044$ s/S, S as 0.0136 s ng⁻¹. These two parameters, the LOD of 1.8 ng and m₀ of 0.32 ng found in this work were largely consistent with the values of 0.85 and 0.24 ng, found in earlier work (Pereira et al., 2015); however, they were lower than those of 1.0 ng and 2.2 ng, respectively, found by Pereira et al. (Pereira et al., 2014) for Cl in biological samples. This difference is according to expectation, as in the latter work a compromise temperature was used, which changed the working range and therefore also the figures of merit.

3.3. Application and evaluation of possible chlorine sources

The developed method was applied for the determination of total chlorine in ten fish oil samples, using the absorption of the SrCl molecule formed in the gas phase of a graphite tube furnace, and the results are shown in Table 3. In order to compare the results found by HR-CS GF MAS, total chlorine was also determined in five samples (raw, bandolado, crude, sample A, and sample B) using micro-coulometric titration, and the results were not significantly different between the two methods (Student's t-test). Among the fish oil samples analyzed with the method, the first one (raw oil) showed the 36 highest concentration of chlorine (56.9 \pm 2.8 μ g g⁻¹) compared to the samples that underwent the cleaning process (intermediate product), the chlorine concentration of which was 3.5 \pm 0.2 μ g g⁻¹. Comparing the results found for raw, bandolado (0.3 \pm 0.5 μ g g⁻¹) and crude oil (26.4 \pm 0.5 μ g g⁻¹), the efficiency of already the first cleaning process as decontaminant becomes obvious, once about 50% of the chlorine was eliminated.

The low concentration of chlorine in the intermediate product reflects the high efficiency of the subsequent process steps employing controlled heating after purification using the inorganic adsorbent. Obviously, a mass balance is not benefited here due to the losses of chlorine caused by the volatilization and/or diffusion of them and a different concentration might be found in the waste fraction (31.1 \pm 2 μ g g⁻¹). The samples A and B, obtained from a local supermarket, showed a similar concentration of chlorine (about 11.5 \pm 0.9 μ g g⁻¹ Cl), and these results were consistent with those found when using micro-coulometric titration.

3.3.1. Liquid-liquid extraction

In order to make sure that the chlorine measured in this direct determination is not coming from ionic forms distributed throughout the fish oil sample, a liquid-liquid extraction using the raw fish oil was performed using water as extractor. The aqueous phase was directly injected onto the platform of the graphite furnace for chlorine determination as SrCl. In this way, if the fish oil would contain such ionic inclusions, chlorine would migrate to the water phase and be detected. So, it would not be possible using the proposed method for a fast screening for chlorinated POPs. However, no difference in the analytical signal was found comparing the water phase from liquid-liquid extraction and the blank solution submitted to the same method of determination. Hence, this is a substantial information that chlorine composes organic molecules or lipid structures, which are in high concentration in oil samples (Pereira et al., 2016), and that the proposed direct method can be used for a fast screening for chlorinated POPs.

3.3.2. Further evaluation of the commercial fish oil capsules

In order to understand better the three commercial fish oil samples and the difference in their chlorine content, we first of all consulted the content of Omega-3 fatty acids, principally docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), claimed on

Table 3
Chlorine determination in fish oil samples by HR-CS GF MAS and micro-coulometric titration. The values represent the mean of three measurements \pm standard deviation (SD).

Sample	Concentration/ $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$		
	HR-CS GF MAS	Coulometric titration	<i>p</i> -value ^a
Raw	56.9 \pm 2.8	55.2 \pm 0.7	0.22
Bandoládo	30.3 \pm 0.5	28.1 \pm 0.6	0.05
Crude	26.4 \pm 0.5	25.7 \pm 0.3	0.10
Sample A	11.5 \pm 0.9	11.4 \pm 0.9	0.90
Sample B	10.1 \pm 0.8	11.5 \pm 0.1	0.15
Waste fraction	31.1 \pm 2.0	nd	–
Intermediate product	3.5 \pm 0.2	nd	–
Commercial 1	17.2 \pm 0.6	nd	–
Commercial 2	<LOQ ^b	nd	–
Commercial 3	<LOQ ^b	nd	–
BCR 181	nd	1400 \pm 21.0 ^c	0.43

nd = not determined.

^a Based on a Student *t*-test at a 95% confidence level ($p > 0.05$).

^b $3.0 \mu\text{g g}^{-1}$ calculated as 10 ng S ($n = 10$), considering 0.4 g of sample diluted to 2 mL using 1-propanol.

^c Certified value: $1380 \pm 50 \mu\text{g g}^{-1}$.

Table 4
Content of omega-3 fatty acids in commercial fish oil capsules claimed on the labels; all values in mg g^{-1} normalized for 1 g of fish oil.

Sample No.	1	2	3
Denomination	Salmon oil, omega-3 concentrate	Omega-3 from salmon & fish oil	Omega-3 salmon oil
Omega-3	300	234	350
DHA	123	94	120
EPA	177	140	180
Σ DHA + EPA	300	234	300

the label of the capsules, which is shown in Table 4. We also compared the color of the three samples, which is shown in Fig. 3, and which might give some insight into the cleaning process that was used for the fish oil. Raw fish oil contains about 300 mg g^{-1} Omega-3 fatty acids with a typical ratio of some 180 mg g^{-1} EPA and 120 mg g^{-1} DHA.

It is obvious from the concentration of DHA + EPA shown in Table 4 that all three products were fish oil, not concentrated fish oil. As sample No. 1 has a darker color compared to the other samples, it has probably not gone through a distillation process, but only through a simple treatment with bleaching clays to remove mucilages, colloids and also arsenic and heavy metals etc. The high chlorine content of $17 \mu\text{g g}^{-1}$ in this sample is consistent with the manufacturing process, which obviously did not include any distillation. As POPs have a higher boiling point than Omega-3 fatty acids, they remain in the residue of the distillation process and are removed from the fish oil fraction. Samples No. 2 and 3, in contrast, have gone through a distillation, which is clearly visible from their lighter color, but only to remove POPs, not to increase the Omega-3 concentration. Sample No. 2 actually has a lower content of omega-3 fatty acids than normal, and it might be suspected that it is a head fraction of the distillation process. In summary, the total chlorine determination appears to be an excellent marker of processing steps of the fish oil and might replace complicated and time-consuming chromatographic measurements in a routine lab.

4. Conclusion

The present work demonstrates the use of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR-CS GF MAS) for the determination of chlorine in fish oil. The absorbance of the SrCl molecule formed in the gas phase of the graphite tube furnace upon the addition of SrCO₃ and heating is an excellent tool for the sensitive determination of chlorine in complex matrices. Zirconium was used as a permanent chemical modifier on the PIN platform in the graphite tube and just a moderate dilution with 1-propanol was employed in order to decrease the high viscosity of fish oil. The developed method can be classified as fast and simple, once no other reagents are added and no sample pre-treatment whatever is necessary. Therefore it is ideally suited for the control of the POPs removal process during the manufacturing of Omega-3 concentrates. This direct analysis approach is also a significant contribution to the accuracy of the procedure, as chlorine can be considered an omnipresent element, and any kind of sample pre-treatment, particularly digestion procedures, might become a source of contamination and error. The

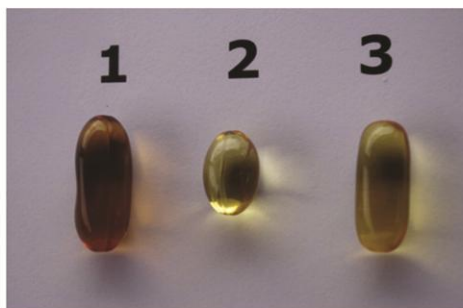


Fig. 3. Appearance of the three commercial fish oil samples used in this work.

good accuracy and precision obtained in this work proves the absence of any significant contamination. The proposed method showed good agreement with the results of an alternative microcolorimetric titration technique (higher than 90%). This and the fact that aqueous standard solutions could be used for calibration further demonstrate the absence of any kind of interference. The determination of total chlorine has been shown to be an excellent marker of the proper removal of POPs during the purification/concentration steps by state-of-the-art molecular distillation, and of the processing steps in general. It might be speculated that this direct analysis approach might be applicable, maybe with some modification, for the determination of other analytes in fish oil and similar lipid matrices.

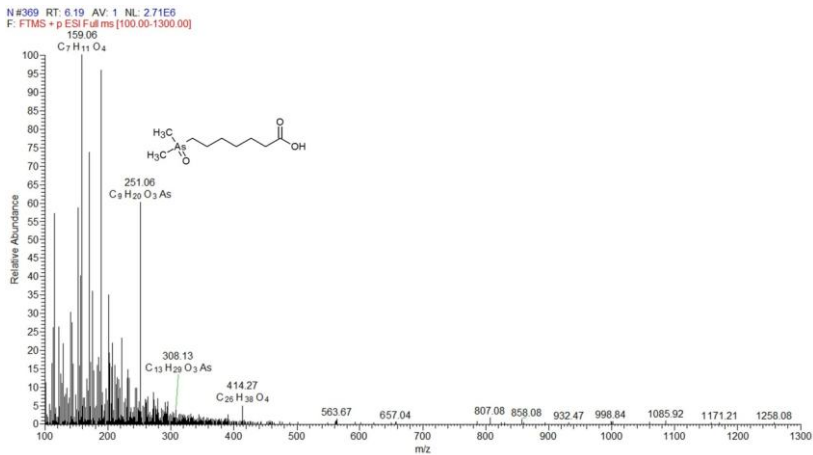
Acknowledgement

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico (CNPq); the present research was mostly financed through Project no. CNPq 406877/2013-0. The authors are also grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and scholarships, and to Analytik Jena for financial support and donation of the contraA 600 high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer.

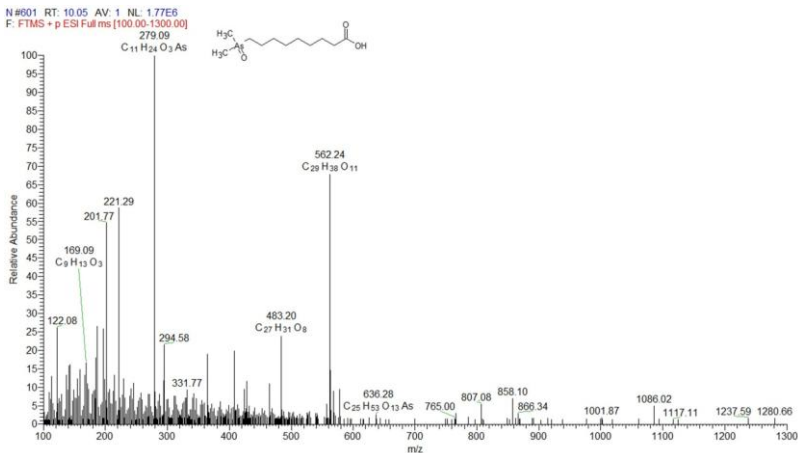
References

- Antes, F. G., Dullius, E. de Costa, A. B., Molf, R. F., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., et al. (2013). Development of a vaporization system for direct determination of chlorine in petroleum coke by ICP-MS. *Microchemical Journal*, 109, 117–121.
- Bechlin, M. A., Ferreira, E. C., & Gomes Neto, J. A. (2017). Determination of chlorine in cement via CaCl₂ molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry with direct solid sample analysis. *Microchemical Journal*, 132, 130–135.
- Blackwell, P. A., Cave, M. R., Davis, A. E., & Malik, S. A. (1997). Determination of chlorine and bromine in rocks by alkaline fusion with ion chromatography detection. *Journal of Chromatography A*, 770, 93–98.
- Butcher, D. J. (2013). Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review. *Analytica Chimica Acta*, 804, 1–15.
- Doyle, A., Saavedra, A., Tristão, M. L. B., Neke, M., & Aucélio, R. Q. (2011). Direct chlorine determination in crude oils by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry: An improved method based on a proper strategy for sample homogenization and calibration with inorganic standards. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 66, 368–372.
- Duarte, F. A., Pereira, E. R., Flores, E. M. M., Muller, E. L., Flores, E. M. M., & Dressler, V. L. (2013). Spectrophotometric determination of chloride in cement after sample preparation by pyrolysis. *Química Nova*, 36, 716–719.
- Enders, M. S. P., Gomes, A. O., Oliveira, R. F., Guimarães, R. C. L., Mesko, M. F., Flores, E. M. M., et al. (2016). Determination of chlorine in crude oil by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using AlCl₃, InCl₃, and SnCl₄ molecules. *Energy and Fuels*, 30, 3637–3643.
- Flores, E. M. M., Barin, J. S., Mesko, M. F., & Knapp, G. (2007). Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — a brief overview and recent applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62, 1051–1064.
- Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Miello, P. A., Barin, J. S., et al. (2008). Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique. *Analytical Chemistry*, 80, 1865–1870.
- Góis, J. S., Pereira, E. R., Welz, B., & Borges, D. L. G. (2014). Simultaneous determination of bromine and chlorine in coal using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and direct solid sample analysis. *Analytica Chimica Acta*, 832, 82–87.
- Góis, J. S., Pereira, E. R., Welz, B., & Borges, D. L. G. (2015). Application of direct solid sample analysis for the determination of chlorine in biological materials using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 105, 12–17.
- Guarda, A., Aramendia, M., Andrés, I., García-Ruiz, E., do Nascimento, P. C., & Resano, M. (2017). Determination of chlorine via the CaCl₂ molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Talanta*, 162, 354–361.
- Heilmann, U., Becker-Ross, H., Florek, S., Huang, M. D., & Okrusch, M. (2006). Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 1314.
- Heilmann, U., Welz, B., Borges, D. L. G., & Lepri, F. G. (2007). Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62, 1222–1230.
- Kaski, S., Häkkinen, H., & Korppi-Tommola, J. (2004). Determination of Cl/C and Br/C ratios in pure organic solids using laser-induced plasma spectrometry in near vacuum ultraviolet. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, 474–478.
- Mello, P. A., Barin, J. S., Duarte, F. A., Bizzi, C. A., Diehl, L. O., Muller, E. L., et al. (2013). Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical samples: A review. *Analytical and Biomolecular Chemistry*, 405, 7615–7642.
- Merib, J., Nardin, G., & Carasek, E. (2014). Use of Doehlert design in the optimization of extraction conditions in the determination of organochlorine pesticides in bovine milk samples by HPLC-MS/MS. *Analytical Methods*, 6, 3254–3260.
- Naladi, F. V., da Veiga, M. A. M. S., Aramendia, M., García-Ruiz, E., & Resano, M. (2015). Chlorine isotope determination via the monitoring of the AlCl₃ molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry — a case study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30, 1531–1540.
- Orzbek, N., & Akman, S. (2016). Determination of chlorine in milk via molecular absorption of SnCl₄ using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 5767–5772.
- Peng, B., Wu, D., Lai, J., Xiao, H., & Li, P. (2012). Simultaneous determination of halogens (F, Cl, Br, and I) in coal using pyrolysis combined with ion chromatography. *Fuel*, 94, 629–631.
- Pereira, E. R., Kopp, J. F., Raab, A., Krupp, E. M., Menyon, J. d. C., Carasek, E. L., et al. (2016). Arsenic containing medium and long chain fatty acids in marine fish oil identified as degradation products using reversed-phase HPLC-ICP-MS/ESI-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31, 1836–1845.
- Pereira, E. R., Rocha, I. M., Cadorní, H. R., Silva, V. D., Welz, B., Carasek, E. L., et al. (2015). Determination of chlorine in coal via the SnCl₄ molecule using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 114, 46–50.
- Pereira, E. R., Welz, B., Lopez, A. H. D., de Góis, J. S., Caramoni, G. F., Borges, D. L., et al. (2014). Strontium mono-chloride — a new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 102, 1–6.
- Smith, F., McMurtrie, A., & Galbraith, H. (1977). Ion Chromatographic determination of sulfur and chlorine using milligram and submilligram sample weights. *Microchemical Journal*, 22, 45–49.
- Welz, B. (2004). High-resolution continuum source AAS: The better way to perform atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 69–71.
- Welz, B., Lepri, F. G., Araújo, R. G. O., Ferreira, S. L. C., Huang, M. D., Okrusch, M., et al. (2009). Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces — a review. *Analytica Chimica Acta*, 647, 137–148.
- Welz, B., Vale, M. G. R., Pereira, E. R., Castilho, I. N. B., & Dessuy, M. B. (2014). Continuum source atomic absorption spectrometry: Past, present and future aspects—a critical review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 799–821.

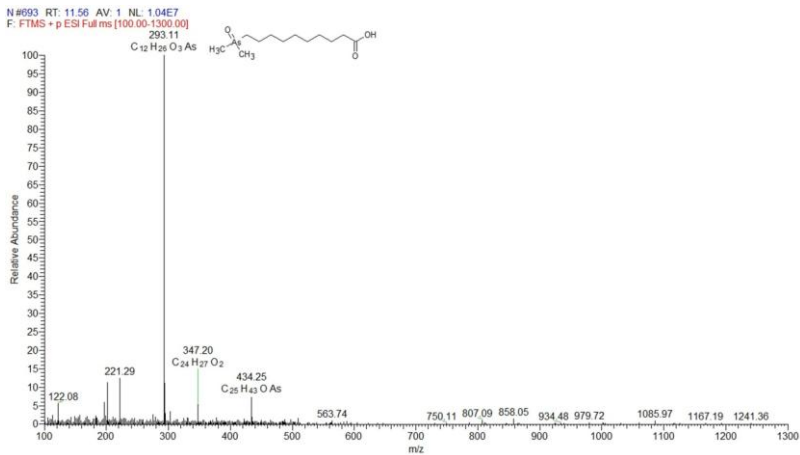
Apêndice 3 -Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_9H_{20}O_3As^+$ (D1), identificado a partir do extrato N purificado



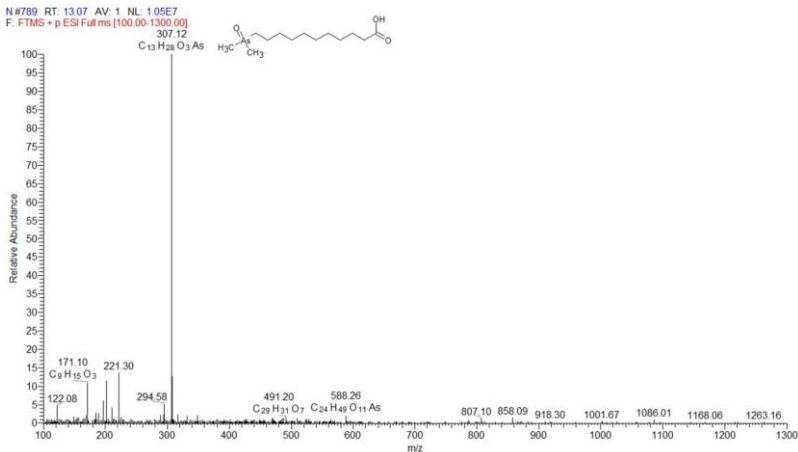
Apêndice 4 -Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{11}H_{24}O_3As^+$ (D2), identificado a partir do extrato N purificado



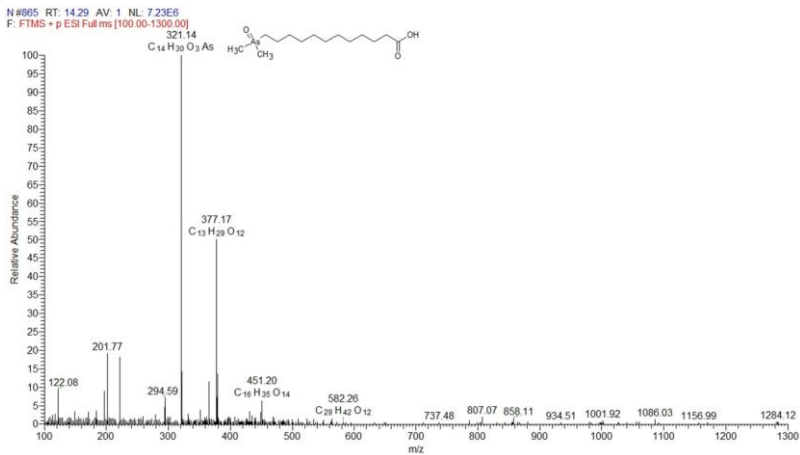
Apêndice 5 -Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{12}H_{26}O_3As^+$ (D3), identificado a partir do extrato N purificado utilizando coluna de fase normal



Apêndice 6 -Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{13}H_{28}O_3As^+$ (D4), identificado a partir do extrato N purificado utilizando coluna de fase normal



Apêndice 7 -Espectro de íons positivos obtidos por ESI-MS para a espécie de arsênio $C_{14}H_{30}O_3As^+$ (D5), identificado a partir do extrato N purificado utilizando coluna de fase normal



Apêndice 8 - Produção científica gerada durante o período de doutorado

Artigos completos publicados em periódicos

1. SCHNEIDER, M; **PEREIRA, EDERSON R**; CASTILHO, IVAN N; CARASEK, E.; WELZ, B.; MARTENS, I. B. G. A simple sample preparation procedure for the fast screening of selenium species in soil samples using alkaline extraction and hydride-generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal (Print)*, v. 125, p. 50-55, 2016.
2. **PEREIRA, EDERSON R**; ALMEIDA, T. S. ; BORGES, DANIEL LAZARO GALLINDO ; CARASEK, E. ; WELZ, B. ; FELDMANN, J. ; MENOYOC, J. C. . Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta (Oxford)*, v. 150, p. 142-147, 2016.
3. **PEREIRA, EDERSON R**; KOPP, JOHANNES F ; RAAB, ANDREA ; KRUPP, EVA ; CARASEK, EDUARDO ; DEL CAMPO MENOYO, JAVIER ; WELZ, BERNHARD ; FELDMANN, JORG . Arsenic containing medium and long chain fatty acids in marine fish oil identified as degradation products using reversed-phase HPLC-ICP-MS/ESI-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry (Print)*, v. 31, p. 1836-1845, 2016.
4. MACHADO, P. M; **PEREIRA, EDERSON R**; MORES, S; WELZ, B; CARASEK, E; ANDRADE, J. B. Fluorine determination in coal using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy*, v. 105, p. 18-24, 2015.
5. CADORIM, HELOISA R; **PEREIRA, EDERSON R**; CARASEK, EDUARDO; WELZ, BERNHARD; DE ANDRADE, JAILSON B. Determination of sulfur in crude oil using High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the SnS molecule in a graphite furnace. *Talanta (Oxford)*, v. 146, p. 203-208, 2015.

6. **PEREIRA, EDERSON R**; ROCHA, L. M; CADORIM, H. R; SILVA, V. D; WELZ, B; CARASEK, E; ANDRADE, J. B. Determination of chlorine in coal via the SrCl molecule using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy*, v. 114, p. 46-50, 2015.
7. CASTILHO, IVAN N; **PEREIRA, EDERSON R**; WELZ, BERNHARD; SHALTOUT, ABDALLAH AMIN; CARASEK, EDUARDO; W. BERNARDO; MARTENS, IRLAND B. . Determination of selenium in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Analytical Methods (Print)*, v. 6, p. 2870-2875, 2014.
8. **PEREIRA, ÉDERSON R**; CASTILHO, IVAN N.B; WELZ, BERNHARD; GOIS, JEFFERSON S; BORGES, DANIEL L.G; CARASEK, EDUARDO; DE ANDRADE, JAILSON B. Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy*, v. 96, p. 33-39, 2014.
9. WELZ, BERNHARD; VALE, MARIA GORETI R; **PEREIRA, ÉDERSON R**; CASTILHO, IVAN N. B; DESSUY, MORGANA B. Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry: Past, Present and Future Aspects - A Critical Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 25, p. 799-821, 2014.
10. **PEREIRA, ÉDERSON R**; WELZ, BERNHARD; LOPEZ, ALFREDO H.D; DE GOIS, JEFFERSON S; CARAMORI, GIOVANNI F; BORGES, DANIEL L.G; CARASEK, EDUARDO; DE ANDRADE, JAILSON B. Strontium monochloride - A new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy*, v. 102, p. 1-6, 2014.
11. DE GOIS, JEFFERSON S; **PEREIRA, EDERSON R**; WELZ, BERNHARD; BORGES, DANIEL L.G. Simultaneous

determination of bromine and chlorine in coal using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and direct solid sample analysis. *Analytica Chimica Acta (Print)*, v. 852, p. 82-87, 2014.

12. COLARES, LIGIA; **PEREIRA, EDERSON R**; MERIB, JOSIAS; SILVA, JULYETTY C; SILVA, JAQUELINE M; WELZ, BERNHARD; CARASEK, EDUARDO; BORGES, DANIEL LAZARO GALLINDO. Application of disposable starch-based platforms for sample introduction and determination of refractory elements using graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry (Print)*, v. 30, p. 381-388, 2014.
13. DE GOIS, JEFFERSON SANTOS; **PEREIRA, EDERSON R**; WELZ, BERNHARD; BORGES, DANIEL L.G. Application of direct solid sample analysis for the determination of chlorine in biological materials using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy*, v. 105, p. 12-17, 2014.

Capítulos de livros publicados

AKMAN, SULEYMAN; WELZ, BERNHARD; OZBEK, NIL; **PEREIRA, EDERSON R**. CHAPTER 5. Fluorine Determination in Milk, Tea and Water by High-Resolution, High-Temperature Molecular Absorption Spectrometry. *Food and Nutritional Components in Focus*. 1ed.: Royal Society of Chemistry, 2015, v. , p. 75-95.